

**Untersuchungen zur Zytoprotektion bei der Anwendung von Wundantiseptika
mittels Lumineszenzmessung und Durchflusszytometrie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Apotheker
Gernot Kissel
aus
Cuxhaven
Marburg an der Lahn 2009

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität als Dissertation angenommen

am 09. November 2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Reinier Mutters

Tag der mündlichen Prüfung am 10. November 2009

**Es nimmt kein Ende mit dem vielen Bücherschreiben,
und zu viel Lernen macht den ganzen Körper müde.
Zu guter Letzt lasst uns das Wichtigste von allem hören:
Begegne Gott mit Ehrfurcht, und halte seine Gebote!**

Das gilt für jeden Menschen.

Die Bibel: Prediger 12, 12b - 13

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Wunde	1
1.2 Wundinfektion	2
1.3 Wundantiseptik	3
1.4 Geschichte der Wundantiseptik	3
1.5 Antiseptika der Gegenwart	4
1.6 Zytotoxizität von Wundantiseptika	7
1.7 Ziel der Arbeit	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3 Verwendete Geräte	14
2.1.4 Vorstellung der verwendeten Antiseptika	15
2.1.4.1 Octenidindihydrochlorid	15
2.1.4.2 Chlorhexidindigluconat	16
2.1.4.3 Polyhexanid	17
2.1.5 Vorstellung der verwendeten potentiell zytoprotektiven Substanzen	18
2.1.5.1 Humanes Serum	18
2.1.5.2 Humanalbumin	19
2.1.5.3 Fetales Kälberserum	19
2.1.6 Vorstellung der verwendeten Zellen	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellkulturmethoden allgemein	20
2.2.1.1 Einfrieren der Zellen	21
2.2.1.2 Auftauen der Zellen	21

Inhaltsverzeichnis	II
2.2.1.3 Passagieren der Zellen	21
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl nach Trypanblaufärbung mittels einer Neubauer-Zählkammer	22
2.2.2 Lumineszenzmessung	23
2.2.2.1 Messprinzip der ATP-Messung	23
2.2.2.2 Messung mit dem Testkit ATPlite 1Step®	24
2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)	27
2.2.3.1 Messprinzip Durchflusszytometrie (FACS)	27
2.2.3.1.1 Messprinzip mit dem Testkit Annexin-V-Fluos®	28
2.2.3.1.2 Messprinzip mit Propidiumiodid	29
2.2.3.2 Messung mit dem Testkit Annexin-V-Fluos® und Propidiumiodid	30
2.2.4 Versuche zur antimikrobiellen Wirkung	31
2.3. Statistische Auswertung	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Ergebnisse und Methodenentwicklung der Lumineszenzmessungen	32
3.1.1 Albumin 5% als Zytoprotektivum	33
3.1.2 Humanes Serum als Zytoprotektivum	35
3.1.3 Fötale Kälberserum (FCS) als Zytoprotektivum	37
3.1.4 Vergleich verschiedener Zytoprotektiva	39
3.1.4.1 Vergleich bei Octenidindihydrochlorid 0,1%	39
3.1.4.2 Vergleich bei Chlorhexidindigluconat 1,0%	41
3.2. Ergebnisse und Methodenentwicklung der Durchflusszytometrie (FACS)	43
3.2.1 Albumin 5% als Zytoprotektivum	43
3.2.2 Humanes Serum als Zytoprotektivum	46
3.2.3 Fötale Kälberserum (FCS) als Zytoprotektivum	49
3.2.4 Vergleich verschiedener Zytoprotektiva	52
3.2.4.1 Vergleich bei Octenidindihydrochlorid 0,1%	52
3.2.4.2 Vergleich bei Chlorhexidindigluconat 1,0%	54
3.2.4.3 Vergleich bei Lavasept® 0,1%	56
3.2.4.4 Vergleich bei Lavasept® 0,2%	58

Inhaltsverzeichnis	III
3.3 Ergebnisse der Versuche zur antimikrobiellen Wirkung	60
3.3.1 Antimikrobielle Wirkung von Octenidindihydrochlorid 0,1%	60
3.3.2 Antimikrobielle Wirkung von Chlorhexidindigluconat 1,0%	60
3.3.3 Antimikrobielle Wirkung von Lavasept® 0,1%	61
3.3.4 Antimikrobielle Wirkung von Lavasept® 0,2%	62
4. Diskussion	63
4.1 Verwendete Methoden	63
4.2 Zytotoxizität der verwendeten Antiseptika	64
4.3 Verwendete Zytoprotektiva	71
4.4 Antimikrobielle Wirkung bei Zytoprotektivaanwesenheit	72
5. Zusammenfassung	73
6. Abkürzungsverzeichnis	75
7. Literaturverzeichnis	77
8. Danksagung	89

1. Einleitung

1.1 Die Wunde

Eine Wunde ist definiert als Gewebsdurchtrennung von Haut, Schleimhäuten oder Organen. Es wird zwischen einfachen, auf die Haut begrenzte Wunden, und komplizierten, in die Tiefe gehende Wunden, die mit einer zusätzlichen Verletzung von Gefäßen, Muskeln und Gewebe einhergehen können, unterschieden [Kujath, P., Michelsen, A. 2008]. Ferner unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Wunden. Akute Wunden sind gekennzeichnet durch eine kurze, in der Regel komplikationslose Wundheilung, die 5 – 10 Tage dauern kann, wenn die Wunde sauber und gut durchblutet ist und die Wundränder dicht beieinander liegen. Beispiele für akute Wunden sind Schnittwunden, Platzwunden, operative Wunden, Verbrennungen und Hauttransplantationen. Von chronischen Wunden spricht man, wenn eine Wunde mindestens 4 – 12 Monate besteht und eine Störung oder Stagnation der Wundheilung vorliegt. Zu chronischen Wunden zählen u. a. Dekubitus und Ulcus cruris.

Das Ziel einer jeden Wundbehandlung ist ein zügiger, dauerhafter Wundverschluss mit folgender, möglichst komplikationsloser Heilung.

Bei der Wundheilung kann zwischen vollständiger und unvollständiger Regeneration unterschieden werden. Wenn nur die Epidermis betroffen ist, ist eine vollständige Regeneration möglich, indem das zerstörte Gewebe wiederhergestellt wird. Geht die Verletzung in die tiefere proliferierende Hautschicht der Basalmembran, findet lediglich eine unvollständige Regeneration mit Bildung eines unspezifischen Ersatzgewebes statt, das Narbengewebe genannt wird [Martin, P. 1997].

Die Wundheilung wird in eine inflammatorische, proliferative und regenerative Phase unterteilt. Zu Beginn der inflammatorischen Phase wird neben einer Entzündungsreaktion die Blutgerinnungskaskade mit der letztendlichen Bildung eines Fibrinpfluges aktiviert. Dieser Fibrinpflug, der sich aus Fibrinfasern, Thrombozyten und Plasmabestandteilen zusammensetzt, schützt die Wunde vor einer Verschmutzung. Thrombozyten setzen verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine frei, wodurch die Wundheilung ausgelöst wird [Martin, P. 1997 und Singer, A.J. et Clark, R.A. 1999].

Neutrophile Granulozyten dringen in die Wunde ein und phagozytieren dort Bakterien und zerstörtes Zellmaterial. Außerdem setzen die Neutrophilen proinflammatorische Zytokine frei, wodurch Keratinozyten und Fibroblasten aktiviert werden [Singer, A.J. et Clark, R.A. 1999]. Makrophagen wandern etwa 2 – 4 Tage nach der Entstehung der Wunde in diese ein und phagozytieren dort unter anderem Bakterien und Zellreste und

setzen weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, womit die Proliferationsphase beginnt [Leibovich, S.J. *et. Ross, R.* 1975]. Die Makrophagen stimulieren ebenfalls die Synthese von Kollagen, die Epithelneubildung und die Angiogenese, wodurch die Wundheilung angeregt wird. Außerdem werden durch Makrophagen Fibroblasten zur Bildung einer kollagenreichen Matrix angeregt. Von Keratinozyten und Fibroblasten freigesetzte Wachstumsfaktoren führen zu einer Neubildung von Gefäßen.

In der letzten Phase der Wundheilung, der Regenerationsphase, nehmen die Anzahl der Blutgefäße und die Dichte der Zellen ab. Myofibroblasten bilden sich aus Fibroblasten, Keratinozyten bewegen sich zum Ausdifferenzieren an die Oberfläche der Wunde und schließlich kommt zu einer Kontraktion der Dermis.

Die Wundheilung der menschlichen Haut, die hier nur kurz angerissen worden ist, ist ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zelltypen und anderer Faktoren. Eine Wundinfektion kann dieses komplizierte Gleichgewicht stören und dadurch zu einer Verzögerung oder Störung der Heilung führen.

1.2 Wundinfektion

Eine Wundinfektion gilt als schwere Störung der Wundheilung. Die Infektion ist zwar zunächst lokal begrenzt aber schon geringe Mengen bakterieller Endo- und Exotoxine können zu lokalen Nekrosen und zu Störungen des Gleichgewichts zwischen Proteasen und Zytokinen in der Wunde und somit zu Störungen in der Wundheilung führen [Ovington, L. 2003]. Eine Wundinfektion kann beispielsweise die Kontraktion der Wunde erheblich behindern. Je nach Art und Ort der Wunde kann durch Wundkontraktion bei einer Vielzahl von Wunden ein Verschluss erreicht werden [Robson, M.C. *et al.* 1990]. Bei Nichtbehandlung kann eine infizierte Wunde zu einer systemischen Infektion oder zu einer Sepsis führen.

In chronischen Wunden finden sich immer Mikroorganismen [De Haan, B.B. *et al* 1974], weshalb der bloße Bakteriennachweis nicht zwingend auf eine Wundinfektion hinweist [Dow, G. *et al* 1999]. Die vorkommenden Mikroorganismen stammen aus der Flora des Menschen oder der Umgebung. Die Bakterienstadien in chronischen Wunden lassen sich in die vier Klassen, Wundkontamination, Wundbesiedlung, kritische Besiedlung und Wundinfektion, einteilen. Wundkontamination heißt, dass keine Mikroorganismen in einer Wunde vorkommen, bei denen eine Replikation stattfindet. Von einer Wundbesiedlung spricht man beim Vorhandensein sich replizierender

Mikroorganismen, die allerdings keine Schädigung hervorrufen. Die Bakterien der Hautflora wie *Corynebacterium*-Arten oder *Staphylococcus epidermidis* sind Beispiele hierfür [Stone, L.L. 1980 und Rodeheaver, G. *et al* 1975]. Bei einer kritischen Besiedlung der Wunde ist die Bakterienkonzentration so hoch, dass die Wundheilung verzögert wird. So konnte in klinischen Studien nur bei Ulzera mit einer Bakterienlast von weniger als 10^6 KBE/g Gewebe eine Anregung der Wundheilung erreicht werden [Kantor, J., Margolis, D.J. 2000 und Browne, A.C. *et al* 2001]. Bei einer noch stärkeren Bakterienbesiedlung der Wunde spricht man von einer Wundinfektion, dadurch kommt es zu einem ständigen Entzündungsgeschehen, das die Wundheilung hemmt. Dass eine Wunde nicht infiziert ist oder eine anfangs sterile Wunde sich nicht infiziert, ist somit eine Voraussetzung für eine effektive Wundbehandlung.

1.3 Wundantiseptik

Eine antiseptische Wundbehandlung gilt als Grundvoraussetzung für eine effektive und zügige Wundheilung. Wundantiseptik ist das therapeutische oder prophylaktische Abtöten, das Inaktivieren oder die Hemmung der Vermehrung von Mikroorganismen durch lokal wirkende chemische Substanzen. Ziel einer jeden antiseptischen Wundbehandlung ist eine Keimzahlreduktion um den Faktor 10^5 .

In Kapitel **1.4** wird näher auf die Geschichte der Wundantiseptik eingegangen. Kapitel **1.5** beschäftigt sich mit den aktuell verwendeten antiseptischen Substanzen.

1.4 Geschichte der Wundantiseptik

Schon Hippokrates befasste sich bei der Behandlung einer Wunde mit einer Wundspülung. Antisepsis als Begriff wurde Ende des 18. Jahrhunderts erstmals von einem britischen Militärarzt im Zusammenhang mit Mitteln gegen Fäulnis verwendet [Pringle, J. 1772]. In der Geschichte der Antiseptik folgte der karbolgetränkte Okklusionsverband [Lister, J. 1875], der immerhin die Rate von Amputationen nach offenen Knochenbrüchen von 60% auf unter 10% senken konnte. Es wurde in der praktischen Anwendung aber ein vermehrtes Auftreten von Gewebnekrosen bis hin zu tödlich ausgehenden systemischen Vergiftungserscheinungen beobachtet, so dass der Erfinder Joseph Lister selbst 1890 diese Methode der Wundantiseptik negativ bewertete. Als nächster Schritt wurde in der Geschichte der Wundantiseptik Chlorzink-Lösung [Kocher, T. zusammengefasst 1981] und die ebenfalls chlorhaltige Dakin'sche Lösung

[Carrel, A. 1917] zur antiseptischen Wundbehandlung eingesetzt. Diese Wundantiseptika hatten bei guter antimikrobieller Wirksamkeit den Nachteil der chlorbedingten Gewebeschädigung. Die Entwicklung ging weiter über Sublimat (Robert Koch), Iodoform (Billroth) und Azofarbstoffen bis hin zu Sulfonamiden. Auch bei diesen Antiseptika traten schwerwiegende Nebenwirkungen sowohl lokal, als auch systemisch in Folge von Vergiftungen auf.

Die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming in der Mitte des 20. Jahrhunderts hat die lokale antiseptische Wundbehandlung zeitweise stark zurückgedrängt. Durch das gehäufte Vorkommen von Resistenzen der Erreger gegen Antibiotika, die teilweise auch durch zu wahlloses Anwenden dieser Arzneistoffe entstanden sind, gewinnt die Wundantiseptik wieder mehr an Bedeutung.

Wundantiseptika sind daher für die heutige Wundbehandlung unabdingbar.

Der zu häufige Einsatz und prophylaktische Einsatz von Antibiotika führte unter anderem auch zu steigenden Kosten für Patienten und Solidargemeinschaft durch Folgebehandlungen [Nelson, C.L. *et al* 1982].

So ist der Einsatz von Wundantiseptika in heutigen Zeiten begrenzter finanzieller Ressourcen ebenfalls ein wichtiger Beitrag zur ökonomischen Behandlung von Patienten.

1.5 Antiseptika der Gegenwart

Eine Vielzahl von Stoffen wird heute zur Behandlung von Wunden eingesetzt. Es gibt große Unterschiede in der Eignung dieser Mittel. In diesem Kapitel soll kurz auf Vor- und Nachteile einiger gebräuchlicher Antiseptika eingegangen werden.

Bei der Auswahl der Wirkstoffe zur antiseptischen Wundbehandlung wird heute auf fünf unterschiedliche Kriterien Wert gelegt. Im Vordergrund steht selbstverständlich eine mikrobizide Aktivität *in vitro*. Desweiteren sollte in klinischen Studien die Effektivität nachgewiesen werden, vor allem in Hinblick darauf, dass Hersteller aus Kostengründen eine Zulassung von Antiseptika als Medizinprodukt gegenüber der Zulassung als Arzneimittel vorziehen. Außerdem dürfen sich keine Resistenzen der Erreger gegen Antiseptika bilden. Als viertes wichtiges Kriterium gilt eine Verträglichkeit des Antiseptikums in der Wunde. Schließlich sollten bei einer antiseptischen Wundbehandlung systemische Nebenwirkungen ausgeschlossen sein.

Unter Abwägung dieser Kriterien werden heute sogenannte Iodophore (z.B. PVP-Iod), Octenidindihydrochlorid, Polyhexanid und Ethanol zur antiseptischen Wundbehandlung empfohlen [Kramer, A *et al* 2006]. Es werden aber in der klinischen Praxis

heute viele andere Wirkstoffe wie Chlorhexidin oder Wasserstoffperoxid eingesetzt. Auf die genannten Antiseptika wird anschließend noch ausführlicher eingegangen.

Iod als Antiseptikum hat schon eine lange Geschichte. Chirurgen setzten bereits 1839 Iodtinkturen zur Behandlung von Kriegswunden ein. Da sich elementares Iod nur sehr schwer in Wasser löst, wird heute Polyvinylpyrrolidon (PVP), auch Povidon genannt, als Trägersubstanz für Iod verwendet. Povidon bewirkt, dass über Wasserstoffbrückenbindungen ein chemisches Gleichgewicht zwischen elementarem Iod, das für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich ist, und dem wasserlöslichen Triiodid entsteht [Schreier, H. *et al* 1997]. Povidon-Iod wirkt sowohl gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien, als auch gegen Pilze, Protozoen, Viren und Sporen. Für die antimikrobielle Wirkung ist vor allem das starke Oxidationspotential von Iod verantwortlich. *In vitro* konnte auch ein positiver Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nachgewiesen werden. So wurde durch PVP-Iod das Ausschütten bakterieller Exotoxine gehemmt und die Inaktivierung gewebstoxischer Enzyme gezeigt [König, B. *et al.* 1997]. Obwohl die Verträglichkeit im Allgemeinen gut ist, kommt es immer wieder zu Kontaktallergien und entsprechenden Reaktionen, wie Urtikaria oder einem anaphylaktischen Schock. Gerade bei langfristiger Anwendung auf großen Wunden kann es aufgrund systemischer Iodresorption zu Störungen der Schilddrüsenfunktion kommen. Dies kann z. B. bei Neugeborenen zu ernsthaften thyreotoxischen Krisen führen [Schönberger, W. *et* Grimm, W. 1982]. Deshalb ist bei hypertyreoten Schilddrüsenerkrankungen oder zeitnah zu Radioiodtherapien die Anwendung kontraindiziert. In Schwangerschaft und Stillzeit, bei Säuglingen bis zum 6. Monat und bei häufigen Anwendungen auf großen Flächen ist eine Anwendung kritisch zu beurteilen und gegebenenfalls die Funktion der Schilddrüse zu kontrollieren.

Octenidindihydrochlorid, dessen chemische Eigenschaften in Punkt **2.1.4.1** genauer betrachtet werden, kann in seiner antimikrobiellen Wirksamkeit mit PVP-Iod verglichen werden, gegen Sporen wirkt es allerdings nicht. Auch gibt es keine Anzeichen, die auf eine teratogene, mutagene oder karzinogene Wirkung schließen lassen. Der Wirkmechanismus der kationenaktiven Substanz beruht auf einer Bindung an die negativ geladenen Zellwände von Bakterien, wodurch die Zellmembran zerstört und das Bakterium schließlich getötet wird. Auch bei diesem antiseptischen Wirkstoff ist ein Einfluss auf das Entzündungsgeschehen zu beobachten. So konnte in einem *in vitro* – Vollblutmodell mit und ohne Zugabe von LPS keine Anregung des Entzündungsmarkers TNF- α gezeigt werden [Menke, H. *et al* 2001].

Polyhexanid, das noch intensiver unter **2.1.4.3** beschrieben wird, erfüllt ebenfalls ausnahmslos, wie PVP-Iod und Octenidindihydrochlorid, die Anforderungen an ein Antiseptikum bezüglich Wirksamkeit gegen alle relevanten Krankheitserreger. Seine längere Einwirkzeit im Vergleich zu Octenidindihydrochlorid *in vitro* ist dosisabhängig. Auch im Vergleich mit PVP-Iod braucht es eine längere Zeit, um zu wirken. So sind gegenüber *Escheria coli*, *Haemophilus influenza*, MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* Einwirkzeiten zwischen 5 und 30 Minuten beschrieben, um eine Keimzahlreduktion auf 1% der Ausgangskeimzahl zu erzielen [Skripitz, R. et Werner, H.P. 1994]. Für die gleichen Mikroorganismen braucht PVP-Iod lediglich eine einminütige Einwirkzeit, um die gleiche Keimzahlreduktion zu erzielen. Polyhexanid wird in der Praxis meist als Spülung oder getränkte Wundkomresse eingesetzt. Insofern ist eine genügende Einwirkzeit gewährleistet. Das polymere Biguanid zählt ebenfalls zu den kationenaktiven Substanzen, die mit den positiv geladenen Bakterienzellmembranen interagieren. Es wird heute vor allem zur Behandlung chronischer Wunden mit einem schlechten Heilungsverlauf und bei der antiseptischen Behandlung von Brandwunden eingesetzt. Zur Spülung von Gelenken ist das polyhexanidhaltige Lavasept® nicht geeignet, da es bei einer Anwendung zu einem negativen Effekt auf die Knorpelsubstanz und zu Störungen des Wachstums kommen kann [Kallenberger, A. et al 1991, Kramer, A. 1998 und Schmidt-Neuerburg, K.P. et al 2001].

Ethanol ist zur Anwendung als Antiseptikum, im Gegensatz zu anderen Alkoholen, generell als geeignet einzustufen [Kramer, A et al 2006]. Es wird derzeit u.a. in der antiseptischen Behandlung des Nabels bei Neugeborenen eingesetzt. Ein bekannter Nachteil der Alkoholanwendung ist das Brennen in der Wunde, das die Compliance und damit den Erfolg einer antiseptischen Behandlung gefährdet. Deswegen wird es heute meist nicht mehr als Monosubstanz, sondern nur noch als Bestandteil in Kombination mit anderen antiseptisch wirksamen Stoffen in niedrigen Konzentrationen bis 10% verwendet.

Chlorhexidindigluconat, siehe auch **2.1.4.3**, wird heute hauptsächlich in der Zahnheilkunde aber auch in der Hautantiseptik eingesetzt. Unter den nicht empfohlenen Wundantiseptika spielt es eine große Rolle. Umstritten ist es vor allem wegen seiner Zytotoxizität. Allerdings kann seine Gewebeverträglichkeit mit zytoprotektiven Zusätzen (z.B. Heilbutteröl) verbessert werden [Kramer, A et al 2006].

Bei der Anwendung von Wasserstoffperoxidlösungen, die durch die Bildung von Sauerstoffradikalen ihre Wirkung entfalten, sind Lücken im Wirkungsprofil neben

zytotoxischen Wirkungen [Doughty, D. 1994 und Higgins K.R. *et al.* Ashry, H.R. 1995] zwei Nachteile und damit entscheidende Gründe für eine zurückhaltende Anwendung. Wenn es heute angewendet wird, dann meistens in Form einer 3%-igen Lösung. Höhere Konzentrationen von z.B. 20% Wasserstoffperoxid haben starke toxische Effekte auf Hautzellen [Izu, K. *et al.* 2000].

Obsolte Wirkstoffe, wie Farbstoffe oder organische Quecksilberverbindungen, spielen aufgrund ihrer selektiven Wirksamkeit und teilweise enormen Toxizität, schon lange keine Rolle mehr in der antiseptischen Wundversorgung.

1.6 Zytotoxizität von Wundantiseptika

In der Geschichte der Wundantiseptik (siehe oben) ist die Gewebetoxizität immer wieder ein Kriterium gewesen, an dem antimikrobiell wirksame Substanzen in ihrer Anwendung letztendlich gescheitert sind.

Damit spielt bei der Entscheidung zur Anwendung eines Antiseptikums neben der im Vordergrund stehenden antimikrobiellen Wirkung die Gewebeverträglichkeit eine entscheidende Rolle. Daher ist in der „Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen in der Wundantiseptik“ die Zytotoxizität als sehr wichtiges Merkmal aufgenommen [Kramer, A. *et al.* 2004(1)].

Um die Verträglichkeit von Wundantiseptika zu vergleichen, wurde von Müller und Kramer der Biokompatibilitätsindex (BI) eingeführt. Dieser Wert eignet sich, um unter gleichen Versuchsbedingungen die Antiseptika zu vergleichen. Der BI ist definiert als Quotient aus der Konzentration Antiseptikum, bei der 50% der Zellen beschädigt werden (IC_{50}) und der Konzentration, die in einem quantitativen Suspensionstest eine Keimzahlreduktion um mindestens 3 log-Stufen (99,9%) erreicht. Ein BI-Quotient von mehr als 1 zeigt eine gute Verträglichkeit, ein kleinerer BI-Wert als 1 deutet auf eine schlechte antimikrobielle Wirkung und hohe Zytotoxizität hin [Müller, G *et al.* Kramer, A 2008]. In nachfolgender Tabelle sind BI-Werte ausgewählter Antiseptika dargestellt. Das Antiseptikum wirkte 30 min auf L929-Zellen (Mäusefibroblasten, ATCC CCL1) im MEM-Zellkulturmedium in Anwesenheit von 10% FCS ein. Als Testkeime wurden *Escheria coli* (ATCC 11229) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) verwendet.

Die Zytotoxizitätsmessungen fanden mit Hilfe der Neutralrotmethode und eines MTT-Tests statt; das Messprinzip dieser beiden Methoden wird anschließend noch ausführlich dargestellt.

Wirkstoff	Biokompatibilitätsindex (BI)	
	L929-Zellen / <i>E. coli</i>	L929-Zellen / <i>S. aureus</i>
Octenidindihydrochlorid	1,73	2,11
Polyhexanid	1,51	1,36
Chlorhexidindigluconat	0,83	0,98
PVP-Iod (bezogen auf I ₂)	0,68	0,68

Biokompatibilitätsindex ausgewählter Antiseptika nach 30-minütiger Einwirkzeit im

MEM-Zellkulturmedium unter Anwesenheit von 10% FCS

[Auszug aus Müller, G *et al* Kramer, A 2008].

Zur Zulassung als Medizinprodukt muss das zytotoxische Potential im quantitativen Wachstumstest beurteilt werden. Dies geschieht nach DIN EN ISO 10993-5 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Teil 5. Prüfungen auf Zytotoxizität: *in vitro* Methoden 1999). Nach 72 h im Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ und Anwesenheit von 10% FCS wird die Vitalität von L929-Zellen (Mäusefibroblasten) nach dem Einwirken des zu prüfenden Antiseptikums gemessen. Diese Zytotoxizitätsmessung geschieht meist mittels des MTT-Tests. Die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase lebender Zellen reduziert bei dieser Testmethode das gelbe Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid] zu einem unlöslichen, blauen Formazanderivat, das sich intrazellulär ablagert. Neuere Untersuchungen ergaben, dass die Reduktion zu großen Teilen auch von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH abhängig ist [Berridge, V.M *et al* 2005]. Das blaue Reaktionsprodukt wird anschließend mit angesäuertem Isopropanol eluiert. Der Überstand wird spektralphotometrisch bei 540 nm gegenüber einer Referenz von 655 nm gemessen. Die Adsorption ist das Maß der Zellvitalität [Mosmann, T. 1983, Müller, G. *et al* 2007].

Eine andere Methode zur Messung der Zytotoxizität ist der Neutralrot-Test (NRU-Test). Das Messprinzip beruht darauf, dass Lysosomen lebender Zellen den Farbstoff aufnehmen. Das kationische Neutralrot gelangt durch Diffusion in die Zellen und bindet an anionisch geladene Reste der lysosomalen Matrix. Wenn z.B. durch Exposition mit einem zytotoxischen Stoff die lysosomale Membran beschädigt ist, wird das Bindungsvermögen für den kationischen Farbstoff vermindert. Die Menge des gebundenen Neutralrots ist ein Maß für die Vitalität der Zellen [Nemes, Z. *et al* 1979, Borenfreund, E. *et al* Puerner, J.A. 1984 und 1985, Babich, H. *et al* Borenfreund, E. 1991].

Zwei weitere Methoden, die ATP-Messung mittels Lumineszenz und die Durchflusszytometrie, zur Messung der Zytotoxizität werden in Abschnitt 2.2 ausführlich vorgestellt.

Alle antiseptischen Arzneistoffe wirken *in vitro* zytotoxisch. Unterschiede in der Zytotoxizität sind bereits in der Beschreibung einiger Antiseptika der Gegenwart in Punkt 1.5 dargestellt. Verschiedene *in vitro* Studien an Fibroblasten und anderen Zelllinien ergaben eine starke Zytotoxizität unterschiedlicher Antiseptika, unter anderem Octenidindihydrochlorid [Kramer, A. *et al* 1993]. Eine geeignete Methode zur Beurteilung der lokalen Gewebeverträglichkeit für Antiseptika ist ein Explantationstest mit Peritonealexplantaten neonataler Ratten. Bei diesen Versuchen wurden für Polyhexanid, Ethanol, Taurolidin und PVP-Iod gute Ergebnisse bezüglich der Zytotoxizität erzielt [Kramer, A. *et al* 1998]. Es bedarf zusätzlich tierexperimenteller und klinischer Studien um diese *in-vitro*-Daten kritisch einzuordnen. So ergaben *in vivo* Studien an Meerschweinchen mit octenidinhaltigen Zubereitungen nach 28 Tagen keinen signifikanten Unterschied im Wundheilungsverhalten im Vergleich zu Ringelösung; die Wundheilung wird durch Octenidin allenfalls etwas verzögert [Kramer, A. *et al* 2004(2)]. An einem *ex vivo* Modell mit einer lebenden Vaginalmukosa konnte elektronenmikroskopisch eine bessere Verträglichkeit von Octenidindihydrochlorid im Vergleich zu PVP-Iod gezeigt werden. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten gab es durch PVP-Iod-Anwendung eine massive Schädigung der Mukosa, Octenidin führte lediglich zu adstringierenden Effekten an den Zellen der Oberfläche; die mittlere Zellschicht der Vaginalmukosa blieb unverändert [Spitzbart, H. 1994]. Ebenfalls gibt es trotz der unbestrittenen *in vitro* Toxizität bei der antiseptischen Behandlung chronischer Wunden keine Hinweise auf eine verzögerte Wundheilung von Clorhexidin, Octenidin und Povidon-Iod [Gruber, R.P. 1975, Viljanto, J. 1980 und Eaglstein, W.H. *et al* Falanga, V. 1997]. Die Ergebnisse von *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen folglich bezüglich der Gewebeverträglichkeit sehr starke Unterschiede.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, drei antiseptische Arzneistoffe, die in der gegenwärtigen antiseptischen Wundbehandlung eine wichtige Rolle spielen, mittels der Methoden der Lumineszenzmessung und der Durchflusszytometrie bei Anwesenheit einer möglicherweise zytoprotektiven Substanz auf ihre Zytotoxizität in einem

Zellkulturmodell zu untersuchen. Es wurden die Antiseptika Octenidindihydrochlorid, Chlorhexidindigluconat und Polyhexanid in zwei Konzentrationen ausgewählt. Es sollte mit beiden Methoden anhand eines Zellmodells untersucht werden, welche Unterschiede es zwischen den Antiseptika bezüglich der Zytotoxizität bei Anwesenheit zytoprotektiver Substanzen gibt. Als zytoprotektive Substanzen wurden Humanes Serum, Albumin 5% und Fötales Kälberserum (FCS) gewählt. Auch die Unterschiede zwischen den eingesetzten Zytoprotektiva sollten herausgefunden werden. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist, dass trotz eventueller Zytoprotektion weiterhin eine antimikrobielle Wirkung beim Einsatz der Antiseptika vorhanden sein muss. Dies sollte ebenfalls überprüft werden.

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Zytotoxizitätsmessungen *in vitro* und *in vivo* besser zu verstehen und zu erklären. Es soll leichter fallen, die drei verwendeten antiseptischen Arzneistoffe besser in Bezug auf ihr zytotoxisches Potential einzuschätzen. Die Auswahl eines geeigneten Antiseptikums soll damit erleichtert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden folgende Chemikalien, Reagenzien und Lösungen verwendet. Für ausführliche Informationen über die Reagenzien sei auf die Kataloge und Produktinformationen der jeweiligen Hersteller verwiesen.

Annexin-V-Fluos®	Roche Diagnostics, Mannheim
Aqua ad iniectabilia	B.Braun, Melsungen
FACSRinse Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSFlow Sheath Flüssigkeit	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSSafe Lösung	Becton Dickinson, Heidelberg
ATPLite 1Step® (Testkit)	PerkinElmer, Boston (USA)
Chlorhexidindigluconat 20%	Apotheke d. Universitätsklinik, Marburg
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum (FBS)	Bio West, Nuaille (F)
Humanalbumin®	ZLB Behring, Marburg
Humanes Serum (v. männlichem AB Plasma)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Inkubationspuffer	10 mM HEPES/NaOH 140mM NaCl 5 mM CaCl ₂ pH 7,40
Lavasept® Konzentrat	Fresenius Kabi, Bad Homburg
L-Cystein CAS 52-90-4	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA, Pasching (A)
L- α -Phosphatidylcholin (Lecithin) CAS 8002-43-5	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neutralisationslösung	20 g/l Tween80 3 g/l Lecithin 1 g/l L-Cystein
Octenidindihydrochlorid	Schülke&Mayr, Norderstedt

PBS-Lösung	Phosphate Buffered Saline 140 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ PO ₄ 2,5 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,25
Penicillin/Streptomycin 10.000 U (100x)	PAA, Pasching (A)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640 BioWhittaker® Medium	Lonza, Verviers (BE)
	<u>Anorganische Salze:</u> 100,00 mg/l Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 400,00 mg/l KCl 100,00 mg/l MgSO ₄ ·7H ₂ O 6000,00 mg/l NaCl 2000,00 mg/l NaHCO ₃ 1512,00 mg/l Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
	<u>Andere Bestandteile:</u> 2000,00 mg/l Glucose 1,00 mg/l Glutathion (reduziert) 5,00 mg/l Phenlrot Na
	<u>Aminosäuren:</u> 200,00 mg/l L-Arginin 50,00 mg/l L-Asparagin H ₂ O 20,00 mg/l L-Asparaginsäure 50,00 mg/l L-Cystin 20,00 mg/l L-Glutaminsäure 10,00 mg/l L-Glycin 15,00 mg/l L-Histidin 20,00 mg/l Hydroxy-L-Prolin 50,00 mg/l L-Isoleucin 50,00 mg/l L-Leucin 40,00 mg/l L-Lysin HCl 15,00 mg/l L-Methionin 15,00 mg/l L-Phenylalanin 20,00 mg/l L-Prolin

	30,00 mg/l L-Serin
	20,00 mg/l L-Threonin
	5,00 mg/l L-Tryptophan
	20,00 mg/l L-Tyrosin
	20,00 mg/l L-Valin
	<u>Vitamine:</u>
	1,00 mg/l p-Aminobenzoessäure
	0,20 mg/l d-Biotin
	0,25 mg/l D-Ca Panthothenat
	0,30 mg/l Cholinchlorid
	1,00 mg/l Folsäure
	35,00 mg/l i-Inositol
	1,00 mg/l Nicotinamid
	1,00 mg/l Pyridoxin·HCl
	0,20 mg/l Riboflavin
	1,00 mg/l Thiamin·HCl
	0,01 mg/l Vitamin B 12
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA Lösung (10x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 80® CAS 9005-65-6	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Für die praktischen Versuche dieser Arbeit wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet. Für ausführliche Informationen sei auf die Kataloge und Produktinformationen der jeweiligen Hersteller verwiesen.

Blutagarplatte Columbia 5% SB COL-S	Becton Dickinson, Heidelberg
Cryo.s Einfrierröhrchen 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CytoTube® Vials	Nunc, Roskilde (DK)
Einmalimpfeschlingen 10µl	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalkanülen Sterican® 0,90x70mm	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen 20ml Luer Solo®	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen 5ml Luer Solo®	B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen BD Plastipak Luer®	Becton Dickinson, Heidelberg

Petrischalen Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen Plastibrand® 200µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen Precision Tips Diamond® 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel (F)
Röhrchen für Durchflusszytometrie 5ml aus Polystyrol	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter FP Point 2 – S®	Schleicher&Schuell, Dassel
Teströhrchen, steril (Cellstar® PP-Test Tubes)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Versiegelungsfolie TopSeal™	PerkinElmer, Boston (USA)
Zellkulturflaschen, steril (Cellstar®) 40ml (25cm ²), 250ml (75cm ²), 550ml (175cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten (Cellstar®)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber Cell Scrape 40cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Verwendete Geräte

Die praktischen Versuche dieser Arbeit wurden mit den Geräten durchgeführt, die in untenstehender Tabelle aufgelistet sind. Für ausführliche Informationen sei auf die Kataloge und Produktinformationen der jeweiligen Hersteller verwiesen.

Absaugpumpe Laboport®	KNF Neuberger, Freiburg
Brutschrank 37°C 5% CO ₂ BBD 6220	Heraeus, Hanau
Drigalski Spatel Borosilikatglas 5mm	Kobe, Marburg
Durchflusszytometer FACS Calibur®	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektronenmikroskop EM 109	Zeiss, Jena
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Mikroskope	Leica, Solms und Zeiss, Jena
MS1® Minishaker	IKA, Staufen
Neubauer Zählkammer Assistent®	Hecht, Sondheim
Pipetboy acu®	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Pipetman®	Gilson, Middleton (USA)
Sterile Arbeitsbank Herasafe®	Heraeus, Hanau

Stoppuhr TR118	Orgeon Scientific, Neu-Isenburg
TopCount NXT®	PerkinElmer, Boston (USA)
Zentrifuge Megafuge 1.0R®	Heraeus, Hanau

2.1.4 Vorstellung der verwendeten Antiseptika

Bei der Auswahl der Antiseptika war es wichtig, heute in der Praxis angewendete Arzneistoffe zu nehmen, um einen klinischen Bezug der Arbeit zu herzustellen. Daher fiel die Auswahl auf die folgenden Stoffe.

2.1.4.1 Octenidindihydrochlorid

Die Substanz Octenidindihydrochlorid (N,N'-(Decane-1,10-diyl-di-1[4H]-pyridyl-4-ylidene) bis (octylammonium) dichlorid) besitzt ein Molekulargewicht von 623,8 g/mol, die CAS-Nummer 70775-75-6 und die Summenformel $C_{36}H_{62}N_4 \cdot 2HCl$. Sie hat zwei kationenaktive Zentren, die nicht interagieren, da zwischen ihnen eine lange aliphatische Kohlenstoffkette (10 CH_2) liegt. Es ist ein weißes bis schwach gelbliches Pulver, in Wasser löslich und hat einen Schmelzpunkt von 214 °C. Octenidindihydrochlorid ist in 0,1%iger Konzentration Bestandteil des Wundantiseptikums Octenisept® der Firma Schülke&Mayr, Norderstedt bei Hamburg.

Das Bispyridinamin wurde vor über 20 Jahren systematisch aus einer Vielzahl von Stoffen dieser Klasse entwickelt [Bailey, D.M. 1984]. Als kationenaktive Substanz bindet Octenidindihydrochlorid schnell an die negativ geladenen Bakterienzellwände, wodurch konsequent die Vitalfunktion der Zellmembran zerstört und damit die Bakterienzelle getötet wird.

Octenidindihydrochlorid (**Abb. 1**) ist unter schwieriger chemischer und physikalischer Umgebung stabil. Stabilitätstests haben ergeben, dass die Substanz in einem pH-Bereich von 1,6 bis 12,2 stabil ist und somit auch in entzündetem Gewebe wirkt. Außerdem ist sie nicht lichtempfindlich und kann bei bis zu 130 °C wasserdampfsterilisiert werden [Harke, H.P 1989].

Octenidindihydrochlorid hat ein breites antimikrobielles Spektrum gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien [Bailey, M. 1984 und Sedlock, D.M. 1985].

Gegen MRSA ist es ebenfalls wirksam [Goroncy-Bermes, P. 1998]. Es ist außerdem viruzid gegenüber lipophilen Viren, wie Hepatitis-B- und *Herpes simplex* Viren und fungizid. Gegen Sporen wirkt es nicht. Außerdem sind bislang keine Resistenzen gegenüber Octenidindihydrochlorid aufgetreten [Giacometti, A *et al* 2002].

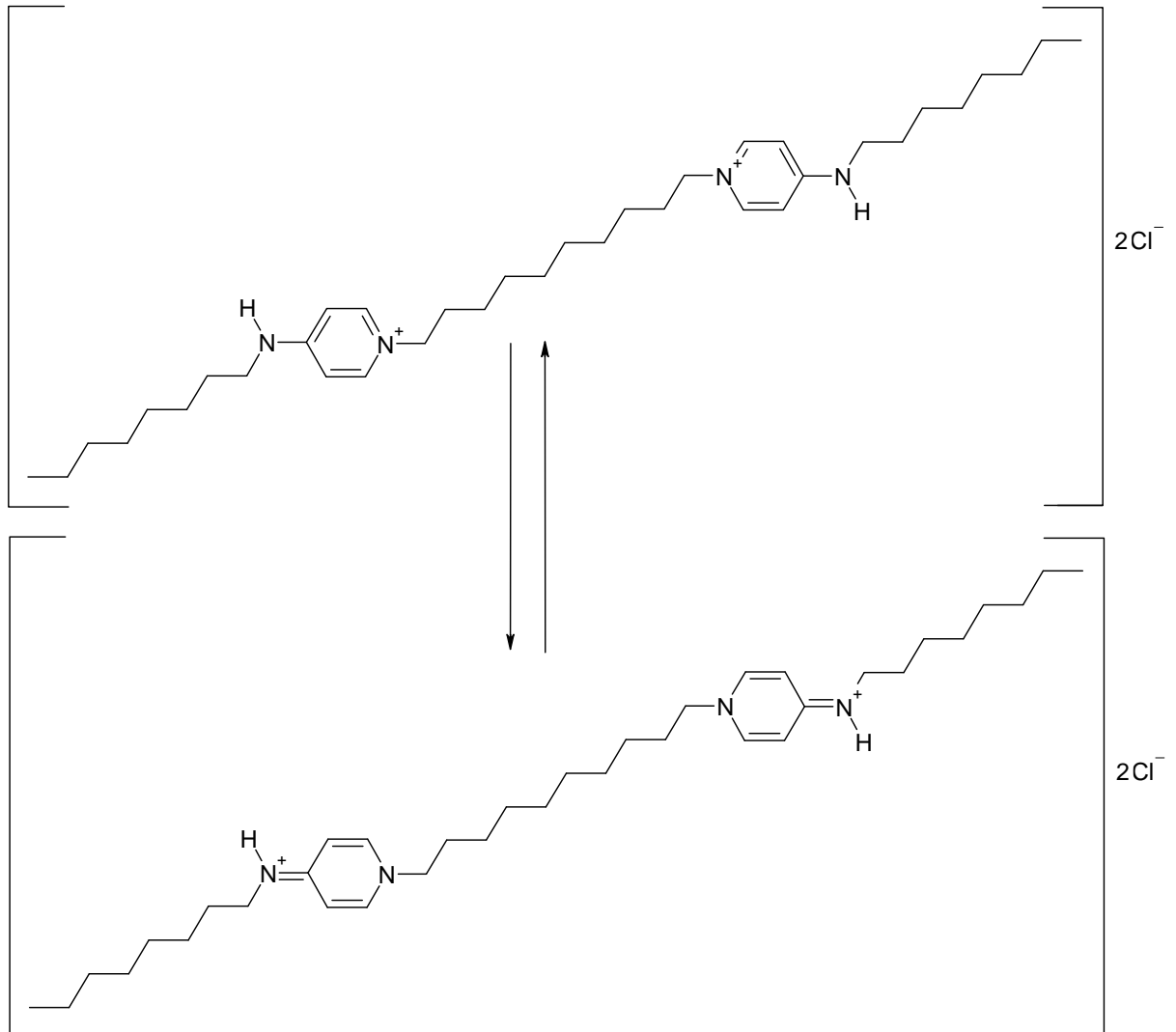


Abb. 1: Strukturformel von Octenidindihydrochlorid

2.1.4.2 Chlorhexidindigluconat

Das Digluconatsalz der Substanz Chlorhexidin (1,1'-Hexamethylenebis(5-[p-chlorophenyl]biguanide)) mit der Summenformel $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2 (C_6H_{12}O_7)$ besitzt ein Molekulargewicht von 879,6 g/mol und die CAS-Nummer 18472-51-0. Es wird in Konzentrationen von 0,03% – 1% in der Zahnheilkunde [Stanley, A. *et al* 1989] eingesetzt. Zur Wunddesinfektion ist es als 1%iges Spray im Handel (Hansaplast med Wunddesinfektionspray®, Firma Beiersdorf, Hamburg)

Chlorhexidindigluconat (**Abb. 2**) zählt chemisch zur Gruppe der Bis-biguanidine. Diese kationische Verbindung hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte zum Standard der antimikrobiellen Wirkstoffe entwickelt. Sein Wirkmechanismus besteht aus einer Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen Chlorhexidinmolekül und den negativ geladenen Phosphatgruppen der Bakterienzellwand [Lindskog, S. 1998].

Chlorhexidindigluconat hat ein breites Wirkspektrum. Die höchste antimikrobielle Aktivität zeigt sich gegen gram-positive Kokken. Die Wirksamkeit gegen gram-positive und -negative Stäbchen ist geringer [Payne, D.N. 1999]. Eine moderate antimikrobielle Aktivität beobachtet man bei behüllten Viren. Eine Resistenz besteht gegenüber säurefesten Stäbchen, Sporen und unbehüllten Viren.

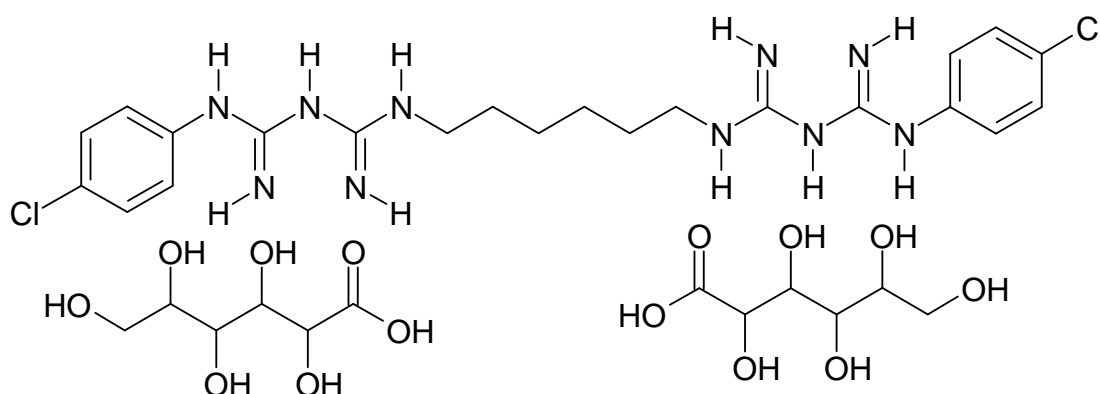


Abb. 2: Strukturformel von Chlorhexidindigluconat

2.1.4.3 Polyhexanid

Der Stoff Polyhexanid (Polyhexamethylenbiguanid), abgekürzt PHMB mit der Summenformel $[C_8H_{17}N_5]_n$ hat die CAS-Nummer 32289-58-0. Er ist mit einem Molekulargewicht zwischen 1700 und 2500 g/mol gemeinsam mit Macrogol 4000 Bestandteil der pharmazeutischen Rezeptursubstanz Lavasept®, Firma B. Braun, Melsungen. Macrogol 4000 dient zum Herabsetzen der Oberflächenspannung. Das Rezepturkonzentrat wird in einer Konzentration von bis zu 0,2 % in Lösungen und Gels eingesetzt.

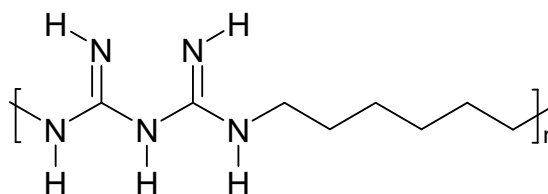


Abb. 3: Strukturformel von Polyhexanid

Polyhexanid (0,2%) hat eine umfassende antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien, auch gegen Problemkeime wie VRE und MRSA. Hefepilze werden nicht vollständig durch Polyhexanid (0,2%) eliminiert [Riekötter, J. *et al* 2007].

Polyhexanid (**Abb. 3**) wird seit 1959 in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie eingesetzt. Seit 1995 steht es in Verbindung mit Macrogol 4000 als Rezepturkonzentrat (Lavasept®) für medizinische Zwecke zur Verfügung. Es sind verschiedene Wundspüllösungen, z.B. Lavanid® 1 (0,02%) und 2 (0,04%), im Handel. Seit November 2006 ist mit Serasept® 1 (0,02%) und 2 (0,04%) ein apothekenpflichtiges Fertigarzneimittel als antiseptische Lösung zugelassen.

Als polymeres Biguanid ist der Wirkmechanismus ebenso wie bei Chlorhexidindigluconat zu erklären. Als kationenaktive Substanz sind die negativ geladenen Zellmembranen der Bakterien der Hauptangriffsort. Es reagiert mit den sauren Phospholipiden der Zytoplasmamembran, wodurch die Funktion dieser verloren geht und das Bakterium abstirbt.

2.1.5 Vorstellung der verwendeten potentiell zytoprotektiven Substanzen

Bei der Auswahl der potentiell zytoprotektiven Substanzen war es wichtig, Stoffe zu nehmen, die in einer gewissen Menge in der Wunde vorkommen. Es wurden die nachfolgend aufgelisteten Stoffe gewählt.

2.1.5.1 Humanes Serum

Als Serum wird die sich bei der Blutgerinnung aus dem Koagulum abscheidende schwach gelb gefärbte Flüssigkeit bezeichnet. Humanes Serum besteht zu 90% aus

Wasser, 7% aus Plasmaproteinen (vor allem Albumin aber auch Lipoproteine und Immunglobuline) und zu 2% aus Elektrolyten. Auch Hormone und eine Vielzahl anderer Stoffe sind Bestandteil des menschlichen Serums. Es unterscheidet sich vom Blutplasma durch das Fehlen des Gerinnungsfaktors Fibrinogen.

2.1.5.2 Humanalbumin

Albumin ist das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein des menschlichen Blutes. Es wird in der Leber produziert. Gemeinsam mit den Globulinen, den anderen Plasmaproteinen des menschlichen Blutes, ist es dort vor allem für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich. Es besteht aus 584 Aminosäuren, ist von elliptischer Gestalt und hat eine Molekülmasse von 66.248 Da. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei 4,6. Albumine können als Ampholyte Anionen und auch Kationen reversibel binden. Im Blut befinden sich 30-50 g/l Albumin. Ihre Serumhalbwertszeit beträgt etwa 20 Tage [Day, J. *et al* 1979 und Curry, S. 2002].

2.1.5.3 Fetales Kälberserum

Fetales Kälberserum (FCS) wird durch Herzpunktion von Rinderföten (3.–7. Trächtigkeitsmonat) nach der Schlachtung gewonnen. FCS ist eine sehr heterogene und komplexe Mischung aus verschiedenen Proteinen, Elektrolyten, Wachstumsfaktoren, Hormonen und anderen Komponenten. Das Serum ist wegen seines hohen Proteingehaltes das am häufigsten verwendete Serum in der Kultivierung eukaryontischer Zellen. Hauptbestandteil ist das Bovine Serum Albumin (BSA).

2.1.6 Vorstellung der verwendeten Zellen

Für die Zytotoxizitätsuntersuchungen war es auf der einen Seite wichtig, epidermale Zellen zu verwenden, da diese Zellen am schnellsten mit dem Antiseptikum in Kontakt kommen, auf der anderen Seite erleichtern einfache Kultivierungsbedingungen die Arbeit ungemein. Deswegen wurden für die Zytotoxizitätsuntersuchungen humane, spontan immortalisierte Keratinozyten (HaCaT-Zellen) verwendet, die von Prof. Dr. Claudio Feliciani, der als Gastwissenschaftler in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr.

Christian Veldman, Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg, tätig war, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

HaCaT-Zellen wurden aus normalen humanen adulten Keratinozyten durch eine Langzeitkultur bei erniedrigter Ca^{2+} -Konzentration und erhöhter Temperatur entdeckt [Boukamp, P. *et al* 1988]. Durch den Namen HaCaT (Ha = Human, Ca = Calcium, T = Temperatur) kann man noch auf die Ausgangsbedingungen bei der Entdeckung schließen.

Normale humane Zellen haben sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine begrenzte Lebenszeit. Die Möglichkeit, sie zu immortalisieren, besteht nur durch DNA-Viren, wie den Adenoviren der Typen 5 und 12, den Humanen Papillomviren der Typen 16, 18 und 33 oder dem Simiavirus vom Typ 40. Eine spontane Immortalisierung oder eine Immortalisierung durch physikalische oder chemische Prozesse finden nur sehr selten statt [zusammengefasst Rhim, JS *et al.* 1990]. Die spontane Immortalisierung von humanen epidermalen Zellen ist lediglich dreimal beschrieben [Baden, H.P. *et al* 1987, Boukamp, P. *et al* 1988 und Rice, R.H. *et al* 1993]. Wachstum, Differenzierungscharakteristik und Signaltransduktionswege der immortalisierten Keratinozyten sind in hohem Maße mit denen der normalen Zellen identisch. HaCaT-Zellen sind die mit Abstand am häufigsten verwendete Zelllinie aus immortalisierten Keratinozyten. Im Vergleich zu viral transformierten Keratinozyten bleiben bei HaCaT-Zellen während mehr als 300 Verdoppelungszeiten und für einen Zeitraum von mehr als 6 Jahren die Nicht-Kanzerogenität und das genetische Material erhalten [Boukamp, P. *et al* 1997].

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden allgemein

Die kultivierten HaCaT-Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 in der Luft in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zur Anzucht wurde das RPMI 1640 Medium (Zusammensetzung: siehe: 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen) mit 1% Penicillin, 1% Streptomycin, 1% L-Glutamin sowie 10% inaktiviertem Fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Die Zellen wurden sowohl in Zellkulturflaschen der Größen 40 ml, 250 ml und 550 ml als auch in 6-Well-Platten (so genannten Erhaltungsplatten) kultiviert. Das Passagieren erfolgte standardmäßig alle 2-3 Tage.

2.2.1.1 Einfrieren der Zellen

Die HaCaT-Zellen werden von der Zellkulturflasche abgelöst und auf eine Konzentration von 10^7 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde das Einfriermedium (20% DMSO, 60% FCS, 20% RPMI 1640 Medium) vorbereitet. Das Einfriermedium wurde im Verhältnis von 1:1 mit dem Zellkulturmedium gemischt. 1 ml der Mischung wurde in ein Kryo-Röhrchen gegeben und sofort eingefroren. Zunächst wurde es für 2 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann für 24 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und schließlich in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Einfrieren erfolgte langsam und somit schonend für die Zellen. Durch DMSO wird eine Eiskristallbildung in den Zellen verhindert; allerdings zeigt DMSO eine zeit- und temperaturabhängige Toxizität gegenüber Zellen. Die Kryoprotektion mit Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde erstmals von Lovelock und Bishop beschrieben [Lovelock, J.E., Bishop, M.W. 1959]. Eine Eigenschaft des DMSO ist seine fast vollständige Penetration in die Zellen [Meryman, H.T. 1971], da es allein im extrazellulären Bereich seine kryoprotektive Wirkung nicht entfalten kann.

2.2.1.2 Auftauen der Zellen

Über längere Zeit im Stickstoffbehälter bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter möglichst schnell bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Die Zellen wurden aus dem Kryo-Röhrchen in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und anschließend abzentrifugiert, um so das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen. Danach wurde das Zellpellet noch zweimal mit Medium gewaschen. Das Pellet wurde im Medium resuspendiert und über Nacht in den Brutschrank gestellt. Der erste Medienwechsel erfolgte am darauf folgenden Tag.

2.2.1.3 Passagieren der Zellen

Die adhärent in der Zellkulturflasche gewachsenen HaCaT-Zellen wurden nach Entfernen des verbrauchten Mediums mit 5-15 ml (je nach Größe der Zellkulturflaschen) Trypsin/EDTA-Lösung (0,5%/0,2%) versetzt und für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch Trypsin werden Membranproteine an den Stellen der Aminosäuren Arginin und Lysin aufgespalten. EDTA wiederum komplexiert Ca^{2+} und Mg^{2+} , was zur Stabilisierung dieser Verbindungen führt. Anschließend wurden die Zellen in der Trypsin/EDTA-Lösung (0,5%/0,2%) bei 1500 U/min für 2 min abzentrifugiert. Es wurde noch zweimal bei 1500 U/min für 2 min mit 20 ml PBS-Lösung (140mM NaCl,

6,5mM Na₂PO₄, 2,5mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄) gewaschen. Von den so behandelten Zellen wurde ein Teil für die Versuche verwendet, der andere Teil wurde wieder im Medium resuspendiert und im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl nach Trypanblaufärbung mittels einer Neubauer-Zählkammer

Für die weiteren Versuche wurde zunächst die Zellzahl bestimmt. Die abgelösten und gewaschenen Zellen wurden in PBS-Lösung (140mM NaCl, 6,5mM Na₂PO₄, 2,5mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄) zu einer Suspension gelöst.

Trypanblau durchdringt die gesunde Zellmembran sehr langsam und färbt ihren Kern dunkelblau. Eine intakte Zellmembran hält diesen Farbstoff vom Zellinneren fern, wogegen Trypanblau eine beschädigte Zellmembran schnell durchdringt. Aufgrund der Membraneigenschaften der Zelle wird auf ihre Vitalität geschlossen.

Trypanblau (**Abb. 4**) ist ein schwach basischer Farbstoff mit einer molaren Masse von 960,8 g/mol und der Summenformel C₃₄H₂₄N₆Na₄O₁₄S₄.

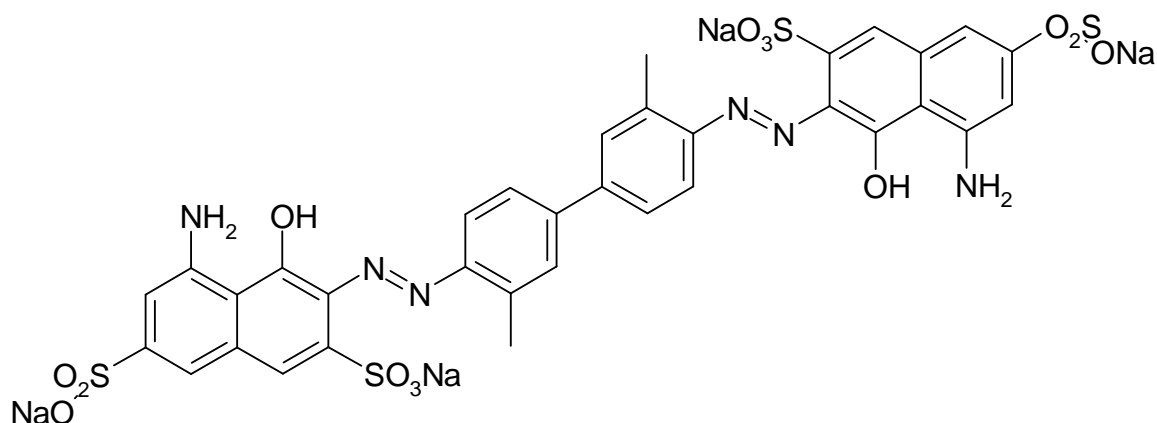


Abb. 4: Strukturformel von Trypanblau

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µl der vorher gut resuspendierten Zellsuspension entnommen und gemeinsam mit 90 µl 0,2%iger Trypanblaulösung in einer Mikrowellplatte gut durchmischt. Mit einer Pipette wurde die entstandene tiefblau gefärbte Suspension in eine Neubauer-Zählkammer seitlich eingebracht und die Zellzahl unmittelbar anschließend unter dem Lichtmikroskop bestimmt.



Abb. 5: Neubauer-Zählkammer [Quelle: Paul Marienfeld GmbH&Co KG]

Die Neubauer-Zählkammer (**Abb. 5**) ist eine 80x30 mm große und 5 mm dicke Glasplatte mit einer vertieften Mittelfläche. Auf dieser Mittelfläche sind Gitternetze eingätzt. Die auszuzählende Zellsuspension wird bei aufgelegtem Deckglas seitlich aufpipettiert und saugt sich durch Kapillarkräfte selbst in diesen definierten Zwischenraum. Die Zellsuspension breitet sich so in einer Schicht mit genau definierter Dicke aus. Nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen unter einem Mikroskop lässt sich deren Anzahl je Volumeneinheit errechnen. Die lebenden Zellen erscheinen nach der Trypanblaufärbung leuchtend transparent, die toten Zellen aufgrund ihrer zerstörten Zellmembran tiefblau. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde durch Auszählen der vier 1x1mm großen Quadranten mit Mittelwertbildung bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde nach der folgenden Formel ermittelt:

$$n \cdot 10^4 (\text{Kamerafaktor}) \cdot 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) = x \text{ Zellen/ml}$$

2.2.2 Lumineszenzmessung

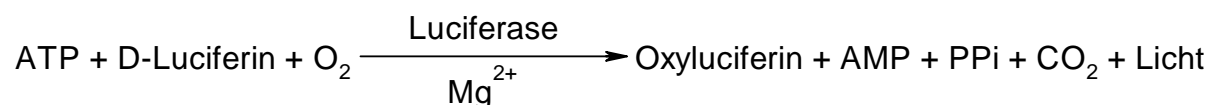
Als Lumineszenz (lat.: *lumen* = Licht) bezeichnet man die optische Strahlung eines physikalischen Systems, die bei einem Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand entsteht. Als Chemilumineszenz bezeichnet man die Emission von Licht, die durch eine chemische Reaktion hervorgerufen wird, ohne eine wesentliche Temperaturerhöhung. Biolumineszenz ist Chemilumineszenz von lebenden Organismen.

2.2.2.1 Messprinzip der ATP-Messung

Das Messprinzip besteht in der Messung von ATP (Adenosintriphosphat), das in allen lebenden Zellen vorkommt und dessen Konzentration bei Nekrose oder Apoptose der Zellen sehr schnell abnimmt. Die Biolumineszenzmessung basiert auf der Produktion von Licht, das bei der Reaktion von ATP mit D-Luciferin, unter Katalyse des Enzyms

Luciferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*). Dies war die erste Luciferase, die biochemisch untersucht wurde [Seliger, H.H. et McElroy, W.D. 1960].

Die Reaktion läuft nach folgendem Schema ab:



Das Substrat D-Luciferin reagiert zunächst mit Mg^{2+} -ATP, es entsteht Luciferyl-Adenylat. Luciferyl-Adenylat wird durch Sauerstoff oxidiert. Als Zwischenprodukte entstehen ATP, ein Dioxetanon sowie cyclisches Peroxid. Durch eine intramolekulare Umstrukturierung wird das Dioxetanon decarboxyliert, wobei eine Keto- und eine Enolform des Oxyluciferins entstehen, das sich im elektronisch angeregten Zustand befindet. Bei dem Übergang des Oxyluciferins vom angeregten Zustand in den Grundzustand wird grün-gelbes Licht der Wellenlänge 560-562 nm emittiert. Nur bei der Katalyse durch die Luciferase ist die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin mit einer Lichtemission verbunden. Das emittierte Licht ist proportional zur ATP-Konzentration und damit zur Anzahl der lebenden Zellen. Zytotoxizitätsuntersuchungen nach diesem Biolumineszenzprinzip wurden erstmals 1984 beschrieben [Kangas, L. et al. 1984].

2.2.2.2 Messung mit dem Testkit ATPlite 1Step®

Zur Messung wurde das Testkit ATPlite 1Step®, Firma PerkinElmer, Boston (USA) verwendet. Als Messgerät diente das TopCount NXT®-Gerät, Firma PerkinElmer, Boston (USA). Bei den Versuchen mit Lumineszenzmessungen wurden die geernteten HaCaT-Zellen zweimal bei 1500 U/min für 2 Minuten mit 20ml PBS-Lösung in der Zentrifuge Megafuge 1.0R® gewaschen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer auf 1000 Zellen/Well eingestellt. Diese Zellen wurden erneut mit RPMI 1640 BioWhittaker® Medium versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension, wie in **Abb. 6** gezeigt, auf die Zellkulturplatten (Cellstar®) aufgebracht. Die Zellkulturplatte (Cellstar®) wurde für 24 Stunden im Brutschrank BBD 6220® bei 37°C, 5% CO₂ bebrütet, damit die adhärennten Zellen am Boden der Zellkulturplatte anwachsen. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in der Zellkulturplatte (Cellstar®) mit 100 µl PBS einmal gewaschen. Nun wurden zunächst

15 µl des Zytoprotektivums und anschließend 10 µl des Antiseptikums bzw. 10 µl PBS-Lösung für den Blindwert in die einzelnen Wells der Zellkulturplatte (Cellstar®) eingebracht. Nach der Einwirkzeit wurden Antiseptikum und Zytoprotektivum mit einer Pipette abgesaugt und es wurde erneut zweimal mit 100 µl PBS-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden nochmals mit 100 µl RPMI 1640 BioWhittaker® Medium versetzt und für 24 Stunden im Brutschrank BBD 6220® bei 37°C 5% CO₂ inkubiert. Ziel der erneuten „Bebrütung“ ist es, den Zellen die Möglichkeit zu geben, sich zu erholen. Am darauf folgenden Tag fand die Messung statt. Die Zellen wurden zunächst mit 100 µl PBS-Lösung gewaschen, um den Farbstoff Phenolrot aus dem Medium zu entfernen, da dieser die Lumineszenzmessung beeinträchtigen könnte. Danach wurde jedes Well mit 100 µl PBS-Lösung gefüllt. Nun wurde das ATPlite1Step®-Testkit zubereitet, indem dem lyophilisierten Substrat eine Pufferlösung zugefügt wurde. Diese Lösung musste 5 min im lichtgeschützten Braunglas stehen, bis sie klar und homogen aussah. Mit einer Mehrfachpipette wurden 100 µl der ATPlite1Step®-Lösung pro Well eingebracht. Im Anschluss wurde für 2 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert. Die Zellkulturplatten (Cellstar®) wurden anschließend mit der Versiegelungsfolie TopSeal™ abgedeckt (**Abb. 7**) und vor der Messung 5 Minuten im TopCount NXT® im Dunkeln adaptiert. Frisch zubereitete ATPlite1Step®-Lösung durfte wegen der nachlassenden Aktivität nur maximal 30 min verwendet werden. Die Lichtemission wurde in RLU (Relativen Lichteinheiten) ermittelt.

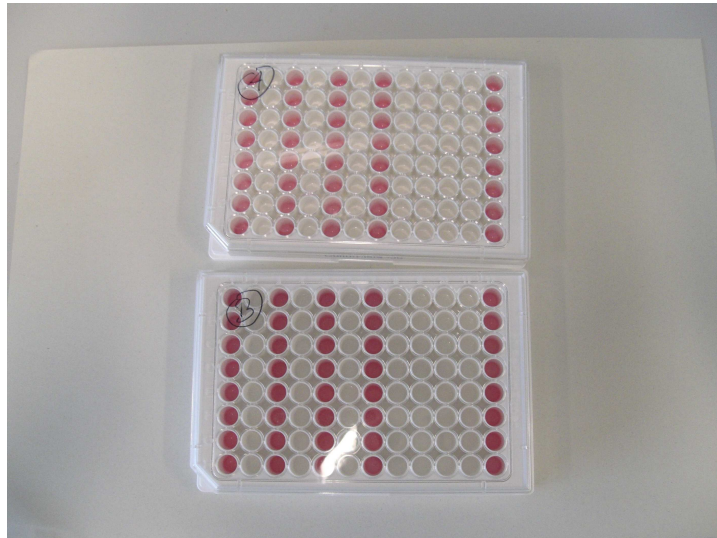


Abb. 6: 96-Well-Zellkulturplatten (Cellstar®) mit Zellsuspension

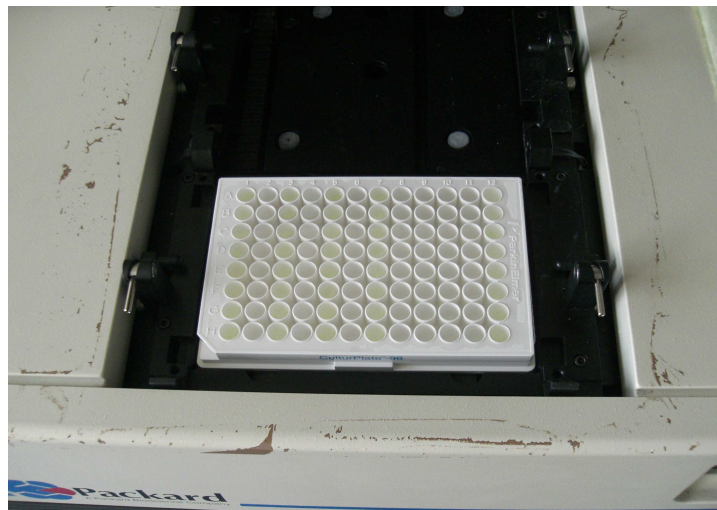


Abb. 7: 96-Well-Zellkulturplatte (Cellstar®) mit ATPlite1Step®-Lösung vor der Adaption im Dunkeln und der Messung im TopCount NXT®-Gerät

2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Messtechnik, bei der Zellen multiparametrisch im Durchflussverfahren gemessen und Fluoreszenz- und Streulichtsignale analysiert werden.

2.2.3.1 Messprinzip Durchflusszytometrie (FACS)

Dem Messprinzip der Durchflusszytometrie (FACS) liegt zugrunde, dass die zu untersuchenden Zellen durch eine Hohnadel mittels Druckluft in die Messküvette des Messgerätes gedrückt werden. Im Messgerät werden sie in einer Flüssigkeit (FACSFlow Sheath Fluid®) transportiert. Die Probe wird durch einen Dioden-Laser bei einer Wellenlänge von 635 nm oder einen Argon-Ionen-Laser, der Licht bei der Wellenlänge 488 nm emittiert, bestrahlt. Durch unterschiedliche Eigenschaften der Zellen in Granularität und Größe wird der Strahl des emittierten Lichts unterschiedlich stark gebrochen. Die Ablenkung des einfallenden Lichts in Richtung des einfallenden Lichtstrahls bezeichnet man als Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter), die Ablenkung des Lichts, das rechtwinklig zum Strahlengang gestreut wird, ist das Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter). Die Zellen können mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochromen) versetzt werden, die je nach Absorptionsspektrum Licht in einer für sie typischen Wellenlänge emittieren. Das bei den Versuchen verwendete Durchflusszytometer FACS Calibur® kann grünes Licht (fluoreszierend emittierendes Licht FL1 mit der Wellenlänge 515 – 545 nm), orangefarbenes Licht (fluoreszierend emittierendes Licht FL2 mit der Wellenlänge 564 – 606 nm), rotes Licht (fluoreszierend emittierendes Licht FL3 mit der Wellenlänge 670 nm) und blaues Licht (fluoreszierend emittierendes Licht FL4 mit der Wellenlänge 653 – 669 nm) erfassen (siehe **Abb. 8**). Zusammen mit dem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können so pro Zelle, die die Laserstrahlen passiert, bis zu sechs Parameter erfasst werden.

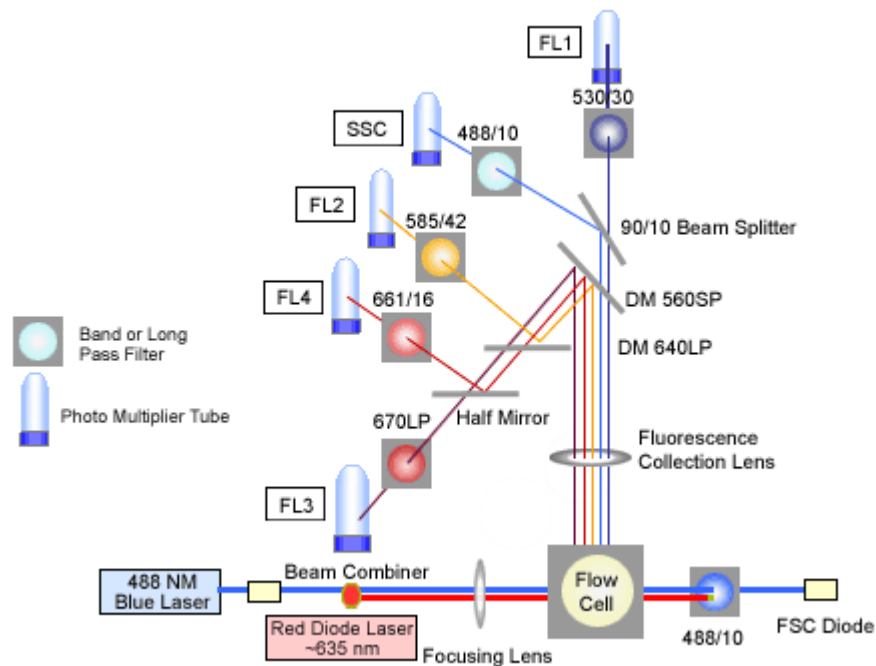


Abb. 8: Optische Bank des FACS Calibur®

[Quelle: The Sickkids – UHN Flow Cytometry Facility at TMDT www.sickkids.ca/fcf/images/FACSlayout.gif]

Mit dem am Durchflusszytometer FACS Calibur® angeschlossenen PC können mit dem Programm CellQuestPro® zwei Parameter gegeneinander in einem Koordinatensystem (Dualparameter) dargestellt werden (siehe **Abb. 9**). So kann die Zahl der gemessenen Partikel bestimmt werden, die eine bestimmte Eigenschaft besitzen. Für die Versuche war nur der Unterschied zwischen lebenden und toten Zellen wichtig.

2.2.3.1.1 Messprinzip mit dem Testkit Annexin-V-Fluos®

Im Frühstadium der Apoptose werden Veränderungen an der Zelloberfläche sichtbar [Andree, H.A. *et al* 1990, Fadok, V.A. *et al.* 1992 und Creutz, C.E. 1992]. Eine dieser Veränderungen der Plasmamembran ist die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zytoplasmamembran auf die Außenseite. Dadurch wird Phosphatidylserin an der Oberfläche der Zelle exponiert [Vermes, I. *et al* 1995]. Fadok *et al* zeigten, dass Makrophagen exponiertes Phosphatidylserin auf der Oberfläche von Lymphozyten während der Apoptose spezifisch erkennen [Fadok, V.A. *et al* 1992]. Die Erkennung und Phagozytose von apoptotischen Zellen schützt Organismen vor dem Kontakt mit zellulären Komponenten, die wiederum zu einer Entzündung führen können, die häufig mit einer Nekrose einhergeht. Annexin-V ist ein Ca^{2+} -abhängiges und phospholipidbindendes Protein mit einer sehr hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Dieses Protein kann dadurch Phosphatidylserin auf der Außenseite apoptotischer

Zellemembranen erkennen und ist somit zur Detektion apoptotischer Zellen in Zellgemischen geeignet [Vermes, I. *et al* 1995, Koopman, G. *et al* 1994, Homburg, C.H. *et al* 1995 und Verhoven, B. *et al* 1995].

2.2.3.1.2 Messprinzip mit Propidiumiodid

Da nach einem Verlust der Zellmembranintegrität nekrotische Zellen ebenfalls Annexin-V binden, kann man zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen einen DNA-Farbstoff, z.B. Propidiumiodid, einsetzen, der nur die durchlässige Membran nekrotischer Zellen passieren kann. Mit DNA interkaliertes Propidiumiodid hat Adsorptionsmaxima von 535 nm und 617 nm.

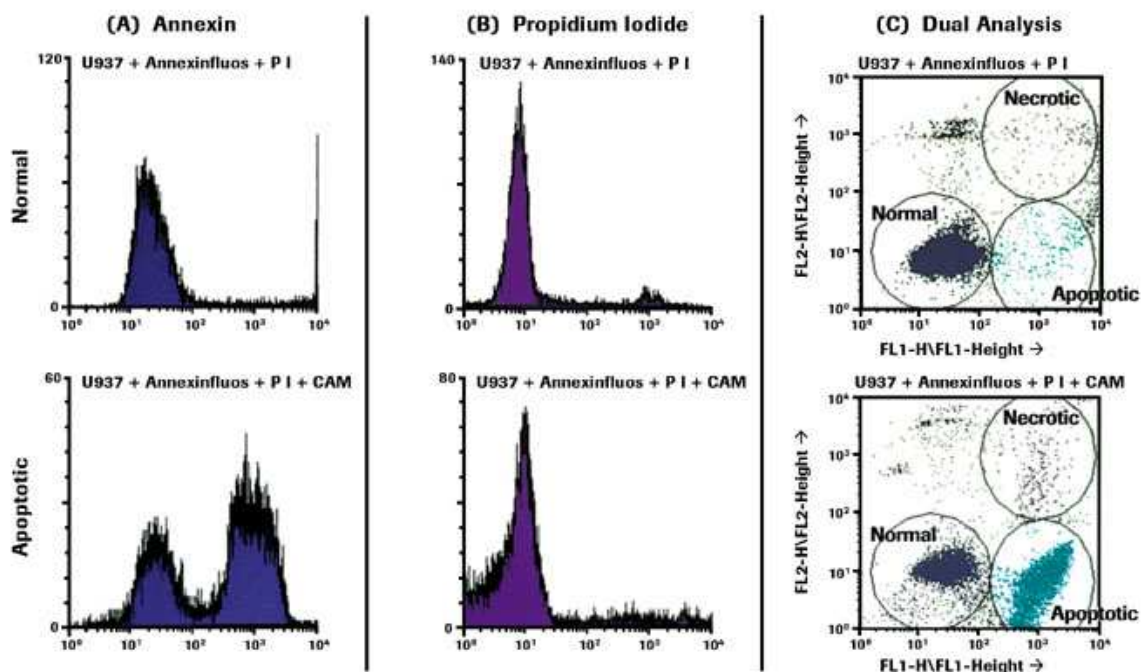


Abb. 9: FACS - Analyse apoptotischer und nekrotischer U937 Zellen nach Behandlung mit Annexin-V-FLUOS® und Propidiumiodid (PI).

Die Zellen wurden für 4 Stunden in Anwesenheit (obere Reihe) oder Abwesenheit (untere Reihe) von 4 µg/ml Camptothecin (CAM) kultiviert.

A: Einfachparameter: Annexin-V-FLUOS®

B: Einfachparameter Propidiumiodid

C: Dualparameter mit Annexin-V-FLUOS® (FL1) and Propidiumiodid (FL2)

[Quelle: Annexin-V-Fluos®-Testkit Version Anleitung 2005, Roche Diagnostics, Mannheim]

2.2.3.2 Messung mit dem Testkit Annexin-V-Fluos® und Propidiumiodid

Zur Messung wurde das Testkit Annexin-V-Fluos®, Roche Diagnostics, Mannheim verwendet. Als Messgerät diente das Durchflusszytometer FACS Calibur®, Becton Dickinson, Heidelberg. Bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden zunächst die HaCaT-Zellen geerntet und anschließend zweimal bei 1500 U/min für 2 Minuten mit 20 ml PBS-Lösung in der Zentrifuge Megafuge 1.0R® gewaschen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer auf 500.000 Zellen/Röhrchen eingestellt. Es wurde noch einmal zentrifugiert, so dass in jedem Röhrchen (5ml Polystyrol, Becton Dickinson, Heidelberg) ein Zellkuchen mit 500.000 Zellen vorhanden war. Anschließend wurde jeweils 1 ml des Zytoprotektivums (Albumin 5%, FCS, Humanes Serum) bzw. 1 ml PBS-Lösung für den Blindwert mit einer Pipette vorsichtig über den Zellkuchen geschichtet. Dann wurde jeweils 1ml des Antiseptikums vorsichtig übergeschichtet. Nach der Einwirkzeit wurde die Flüssigkeit vorsichtig aus dem Röhrchen abgesaugt (Absaugpumpe Laboport®, KNF Neuberger, Freiburg). Danach wurde die Annexin-V-Fluos®/PI-Lösung frisch hergestellt. Dazu wurden für 10 Messungen 20 µl Annexin-V-Fluos®-Reagenz in 1 ml Inkubationspuffer (10 mM HEPES/NaOH, 140mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,40) gelöst und anschließend 20 µl einer Propidiumiodid-Stammlösung (50 µg/ml) zugegeben. 100 µl dieser Annexin-V-Fluos®/PI-Lösung wurden in ein 5 ml Röhrchen gegeben. Der Zellkuchen wurde anschließend mit einer Pipette gut resuspendiert. Nach 10 – 15 Minuten Inkubationszeit und Verdünnung mit 1 ml PBS wurden die Messungen im Durchflusszytometer FACS Calibur® durchgeführt und anschließend die Ergebnisse mit CellQuestPro® ausgewertet. Für die Versuchsauswertung war nur der Anteil lebender, normaler Zellen (**Abb. 9c**) interessant. Trotzdem musste sowohl Annexin-V-Fluos® als auch Propidiumiodid benutzt werden, um alle apoptotischen und nekroischen Zellen zu erfassen. Nur so konnte im Ausschlussverfahren der Anteil lebender Zellen ermittelt werden.

2.2.4 Versuche zur antimikrobiellen Wirkung

Neben den Zytotoxizitätsuntersuchungen war es wichtig, eine nach wie vor vorhandene antimikrobielle Wirksamkeit nachzuweisen. Die Versuche wurden mit dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* als Indikatorkeim durchgeführt. Hierzu wurden 24 Stunden bei 37 °C auf Columbia®-Schafblutplatten bebrütete *S. aureus* (ATTC 29213)-Kolonien in jeweils 1 ml Zusatz (PBS/Albumin5%/FCS/Humanem Serum) gelöst, so dass sich eine Ausgangskonzentration von etwa 10^9 KBE/ml ergab. Anschließend wurde 1 ml Antiseptikum (Octenidindihydrochlorid 0,1% / Chlorhexidindigluconat 1,0% / Lavasept® 0,1% / Lavasept® 0,2%) zugesetzt.

Nach 10 Minuten Einwirkzeit wurden 5 ml einer Neutralisationslösung (20 g Tween 80, 3g Lecithin, 1g L-Cystein pro Liter) zugegeben. Es wurde mit PBS eine Verdünnungsreihe erstellt und anschließend auf Columbia®-Schafblutplatten mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Pro Zusatz (PBS / Albumin5% / FCS/Humanem Serum) wurde ein Blindversuch durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die KBE bestimmt und im Vergleich zur Blindprobe die Keimzahlreduktion ermittelt. Aus zwei von einander unabhängigen Dreifachversuchen wurde der Mittelwert bestimmt.

2.3. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Messergebnisse wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Messreihen mit dem Computerprogramm Microsoft Excel® berechnet. Um die Mittelwerte zweier Messreihen miteinander vergleichen zu können und die Signifikanz der Ergebnisse zu bestimmen, wurde nach Prüfung auf Normalverteilung der Ergebnisse ein zweiseitiger t-Test bei voneinander unabhängigen Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 0,05$ durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden nach Methoden getrennt dargestellt. Zuerst werden die Ergebnisse aus den Versuchen mit Lumineszenzmessung, anschließend die Versuchsergebnisse der Durchflusszytometrie und schließlich die Ergebnisse der Versuche zur antimikrobiellen Wirksamkeit dargestellt.

3.1 Ergebnisse und Methodenentwicklung der Lumineszenzmessungen

Bevor verwertbare Ergebnisse gewonnen werden konnten musste die Methodik der Lumineszenzmessungen den Versuchsbedingungen angepasst werden.

Obwohl mit dem ATPlite1Step®-Testkit bei den verwendeten 96-Well-Platten nach Angaben des Herstellers bis zu 50000 Zellen/Well erfasst werden können, hat sich gezeigt, dass 1000 Zellen/Well für die HaCaT-Zellen die optimale Zellzahl ist, da sonst der Blindwert ohne Zugabe von Antiseptikum zu hoch und nicht mehr detektierbar ist.

Eines der größten Probleme zu Beginn der Versuche war die Überlappung der Messergebnisse, der so genannte „Cross-Talk“. Bei stark unterschiedlichen Lichtemissionen konnte so der Messwert verfälscht werden. Schwarze Zellkulturplatten zeigen im Gegensatz zu den verwendeten weißen Platten nur eine minimale Phosphoreszenz, weswegen die weißen auch zunächst im Messgerät 5 min im Dunkeln adaptiert wurden.

Nach Rücksprache mit dem Hersteller PerkinElmer, Boston (USA) fiel der Entschluss, schwarze Platten auszutesten. Die Ergebnisse zeigten allerdings keine nennenswerten Unterschiede, so wurde aus Kostengründen wieder zu den weißen Platten zurückgekehrt. Die einfachste und beste Lösung im Überwinden des „Cross-Talk“ bestand darin, zwischen jeder Wellreihe eine leere Reihe als „Puffer“ zu lassen (siehe **Abb. 6**).

Die Messung des Anteils der relativen Lichteinheiten (RLU) im Vergleich zur Blindprobe (ohne Antiseptikum) bildeten das einzig sinnvolle Messergebnis, da die Zellzahl durch das zweimalige erneute Bebrüten zum Zweck des Anwachsens an der Platte und dem Ausschluss einer möglichen Erholung der Zellen, nicht aussagekräftig war. Alle nachfolgend dargestellten Anteile überlebender Zellen sind gegenüber 10µl PBS-Lösung als Blindwert gemessen worden.

3.1.1 Albumin 5% als Zytoprotektivum

Die Einwirkzeiten des Antiseptikums bei diesen Versuchen waren 10 Sekunden, 1 Minute und 10 Minuten. In 7 bis 30 voneinander unabhängigen Messungen konnten bei 15 µl Albumin-5% Zusatz folgende Anteile überlebender HaCaT-Zellen mit 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% zu den verschiedenen Einwirkzeiten ermittelt werden:

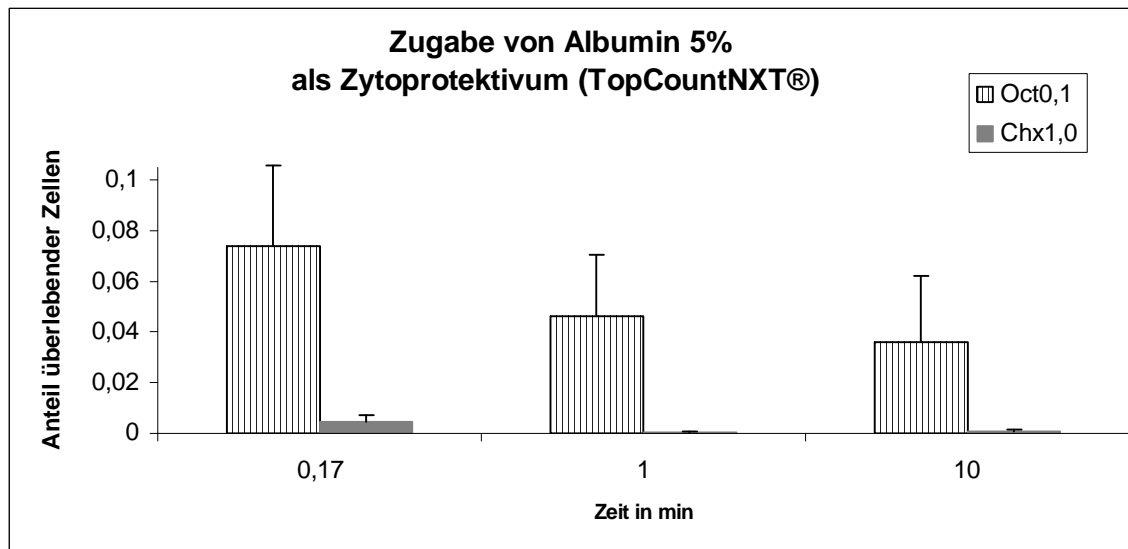


Abb. 10: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von Albumin 5% als Zytoprotektivum (TopCount NXT®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0%

Nach der Einwirkzeit von $t=10$ sec war zwischen 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,074**) und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,005**) ein signifikanter Unterschied ($p = 0$) im Anteil der überlebenden Zellen erkennbar. Somit ist zu diesem Zeitpunkt Octenidindihydrochlorid 0,1% deutlich schwächer zytotoxisch als Chlorhexidindigluconat 1,0%.

Bei den Messungen nach den Einwirkzeiten $t = 1$ min und $t = 10$ min konnte man ebenfalls signifikante Unterschiede (p jeweils = 0) in den Anteilen überlebender Zellen von 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% ($t = 1$ min: **0,046** und $t = 10$ min: **0,036**) und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% ($t = 1$ min: **0,002** und $t = 10$ min: **0,001**) erkennen (**Abb. 10**). Es ist deutlich, dass bei den Einwirkzeiten von 10 sec, 1 min und 10 min bei Anwesenheit von 15 µl Albumin 10 µl des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid 0,1% weniger zytotoxisch gegenüber HaCaT-Zellen sind, als die gleiche Menge Chlorhexidindigluconat 1,0%.

Die Anteile überlebender HaCaT-Zellen unter den gleichen Bedingungen wurden in $n = 7$ voneinander unabhängigen Messungen für die Lavasept®-Konzentrationen 0,1% und 0,2% nach den Einwirkzeiten von $t = 1$ min und $t = 10$ min bestimmt.

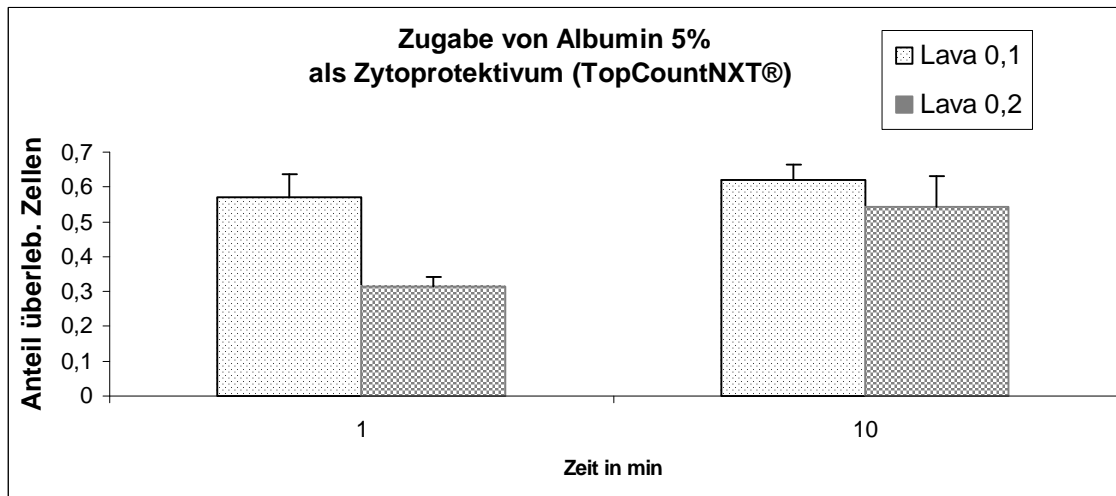


Abb. 10a: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von Albumin 5% als Zytoprotektivum (TopCount NXT®) mit Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2%

10 μ l Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2% (**Abb. 10a**) haben bei $n = 7$ Messungen nach $t = 1$ min bei einen Anteil überlebender Zellen von **0,557** bzw. **0,316** einen signifikanten Unterschied ($p = 0$) und nach $t = 10$ min keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,074$) im Anteil überlebender Zellen von **0,619** bzw. **0,562**.

Beide Lavasept®-Konzentrationen haben nach den Einwirkzeiten von 1 Minute und 10 Minuten deutlich höhere Anteile überlebender Zellen als sowohl Octenidindihydrochlorid 0,1%, als auch Chlorhexidindigluconat 1,0%. Im Vergleich der beiden Lavasept®-Konzentrationen untereinander hat zumindest nach 1 Minute Einwirkzeit die 0,1%-ige Lösung einen deutlich höheren Anteil an überlebenden Zellen als die 0,2%-ige Lösung.

3.1.2 Humanes Serum als Zytoprotektivum

Bei den Messungen, in denen die Überlebensrate der HaCaT-Zellen bei Anwesenheit von Humanem Serum mittels ATP-Messung per Lumineszenz bestimmt wurde, konnten in 8 bis 36 Messungen, die voneinander unabhängig waren, bei 15 µl Zusatz des Humanen Serums untenstehende Anteile (**Abb. 11**) überlebender HaCaT-Zellen mit 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% gemessen werden:

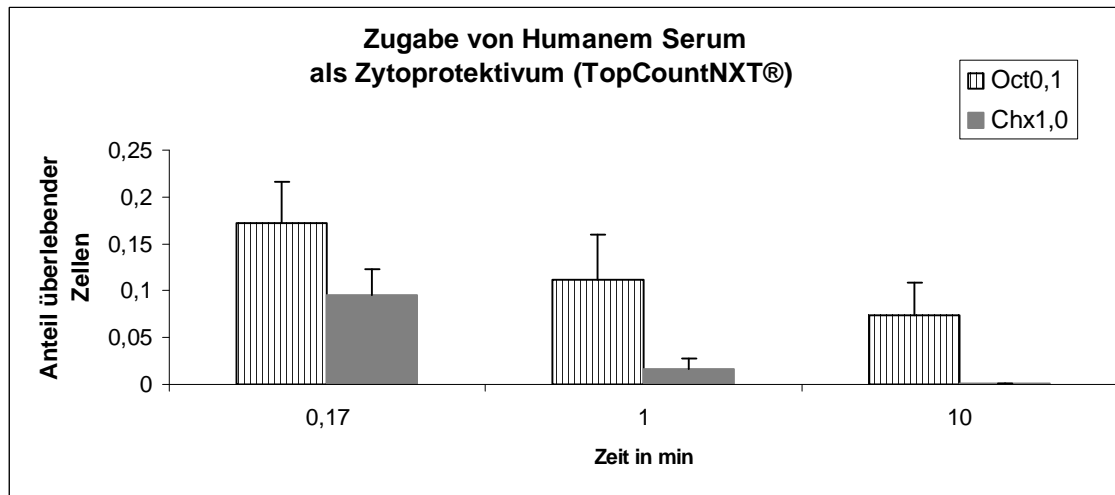


Abb. 11: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von Humanem Serum als Zytoprotektivum (TopCount NXT®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0%

Bei allen Einwirkzeiten von $t = 10$ sec über $t = 1$ min bis $t = 10$ min konnte man signifikante Unterschiede in den Anteilen überlebender Zellen von 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% ($t = 10$ sec: **0,172**, $t = 1$ min: **0,111** und $t = 10$ min: **0,068**) und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% ($t = 10$ sec: **0,095**, $t = 1$ min: **0,021** und $t = 10$ min: **0,001**) erkennen. Sämtliche p-Werte im Vergleich der beiden Messreihen waren $p = 0$.

Auch bei Einsatz von 15 µl Humanem Serum als potentiell zytoprotektiver Substanz waren 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% bei allen drei gemessenen Zeiten deutlich stärker zytotoxisch als 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1%.

Bei den gleichen Versuchsbedingungen wurden auch Lavasept 0,1% und Lavasept® 0,2% untersucht. Hierbei wurden in 5 bis 15 voneinander unabhängigen Messungen bei jeweils 15 µl Zugabe Humanen Serums folgende Anteile (**Abb. 11a**) überlebender HaCaT-Zellen mit jeweils 10 µl Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2% gemessen:

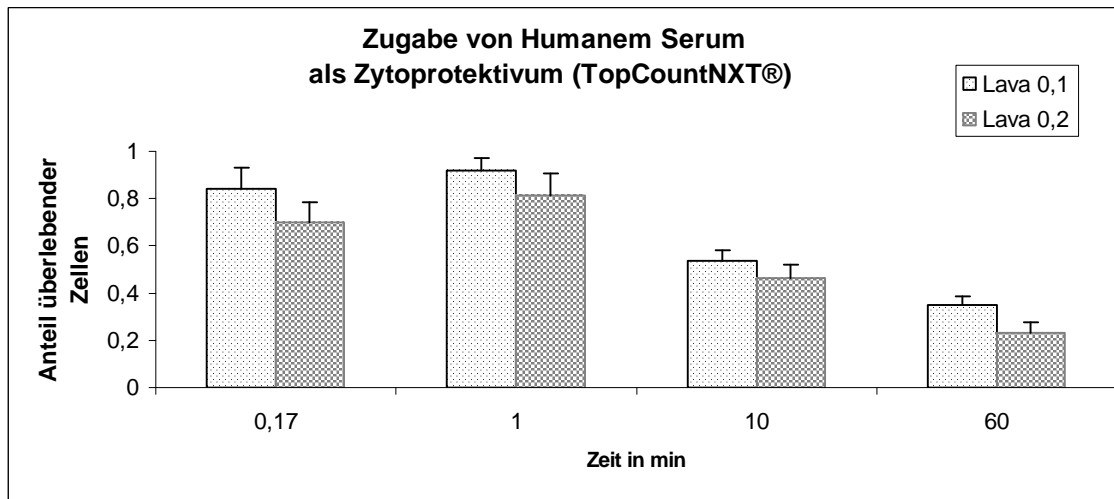


Abb. 11a: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von Humanem Serum als Zytoprotektivum (TopCount NXT®) mit Lavasept® 0,1% und 0,2%

Nach $t=10$ sec (**0,841** zu **0,643**) ist bereits ein signifikanter Unterschied ($p = 0,001$) zwischen beiden Lavasept®-Konzentrationen erkennbar. Auch nach der Einwirkzeit $t=1$ min (**0,929** zu **0,815**, $p = 0,005$) und $t = 10$ min (**0,536** zu **0,462**, $p = 0,038$) sind signifikante Unterschiede in den Anteilen überlebender Zellen bei Anwendung der beiden Lavasept®-Konzentrationen 0,1% und 0,2% zu verzeichnen. Ebenso sind nach $t = 60$ min signifikante Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen 10 μ l Lavasept® 0,1% und 10 μ l Lavasept 0,2% (**0,349** zu **0,232**, $p = 0,001$) festzustellen (**Abb. 11a**).

Die 0,1%-ige Lavasept®-Lösung ist zu allen vier gemessenen Einwirkzeiten $t = 10$ sec, $t = 1$ min, $t = 10$ min und $t = 60$ min bei Anwesenheit des Humanen Serums geringer zytotoxisch als eine 0,2%-ige konzentration der Lösung.

Die Unterschiede von Lavasept® 0,1% und 0,2% zu den Anteilen überlebender Zellen bei 10 μ l Octenidindihydrochlorid 0,1% und 10 μ l Chlorhexidindigluconat 1,0% bei den jeweiligen Einwirkzeiten (s.o.) sind alle signifikant, jedoch aufgrund der großen Unterschiede nicht in einer Graphik darstellbar. Es ist festzuhalten, dass bei Einsatz von 15 μ l der zytoprotektiven Substanz Humanes Serum bei sämtlichen gemessenen Einwirkzeiten 10 μ l der beiden Lavasept®-Konzentrationen wesentlich besser zellverträglich sind als die gleichen Mengen Octenidindihydrochlorid 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0%.

3.1.3 Fötales Kälberserum (FCS) als Zytoprotektivum

Nach 5%iger Albuminlösung und Humanem Serum war Fötales Kälberserum die dritte untersuchte Substanz, von der eine zytoprotektive Wirkung angenommen wurde.

Beim Einsatz von Fötalem Kälberserum (FCS) als Zytoprotektivum wurden in 7 bis 16 voneinander unabhängigen Messungen bei einem Zusatz von 15 µl untenstehende Anteile (**Abb.: 12**) überlebender HaCaT-Zellen bei einem Antiseptikaeinsatz von 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% gemessen:

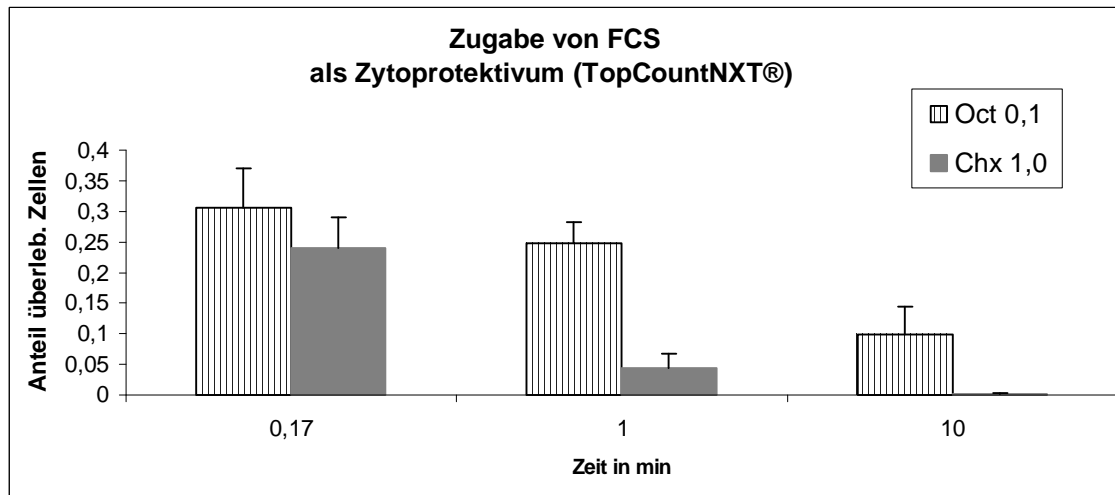


Abb. 12: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von FCS als Zytoprotektivum (TopCount NXT®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0%

Nach einer Einwirkzeit von $t=10$ sec sind zwischen 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,306**) und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,230**) signifikante Unterschiede erkennbar, der p-Wert beträgt $p = 0,020$.

Bei den Zeiten $t = 1$ min und $t = 10$ min kann man ebenfalls signifikante Unterschiede (p jeweils = 0) in der Zytotoxizität von 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% ($t=1$ min: **0,247** und $t=10$ min: **0,099**) und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% ($t=1$ min: **0,047** und $t=10$ min: **0,002**) erkennen (**Abb. 12**).

Bei $t=60$ min (nicht in der Abbildung) betragen die Anteile überlebender Zellen für $n = 8$ voneinander unabhängigen Messungen für 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1% **0,039** (SD: 0,010) und 10 µl Chlorhexidindigluconat 1,0% **0,002** (SD: 0,001), dieser Unterschied ist mit $p = 0$ ebenfalls signifikant.

Es lässt sich festhalten, dass bei den gemessenen Einwirkzeiten $t = 10$ Sekunden, $t = 1$ Minute, $t = 10$ Minuten und $t = 1$ Stunde das zytotoxische Potential der 1,0%-igen Chlorhexidindigluconatlösung deutlich stärker ist als das von Octenidindihydrochlorid 0,1%.

Bei sämtlichen Versuchen mit Lumineszenzmessungen ist Chlorhexidindigluconat 1,0% sowohl bei Einsatz von Humanem Serum, als auch von Albumin 5% und FCS das Antiseptikum mit dem deutlich stärksten zytotoxischen Potential.

3.1.4 Vergleich verschiedener Zytoprotektiva

Nach den Ergebnissen im Vergleich der unterschiedlichen Antiseptika werden nun die Ergebnisse der Zytoprotektiva FCS, Albumin 5% und Humanes Serum untereinander verglichen.

3.1.4.1 Vergleich bei Octenidindihydrochlorid 0,1%

Zum Vergleich der verschiedenen Zytoprotektiva bei Octenidindihydrochloridlösung 0,1% wurden in 16 bis 25 Messungen, die voneinander unabhängig waren, bei 10 µl Octenidindihydrochlorid 0,1%-Zugabe bei den Einwirkzeiten $t = 10$ Sekunden, $t = 1$ Minute und $t = 10$ Minuten folgende Überlebensraten der HaCaT-Zellen festgestellt (Abb. 13):

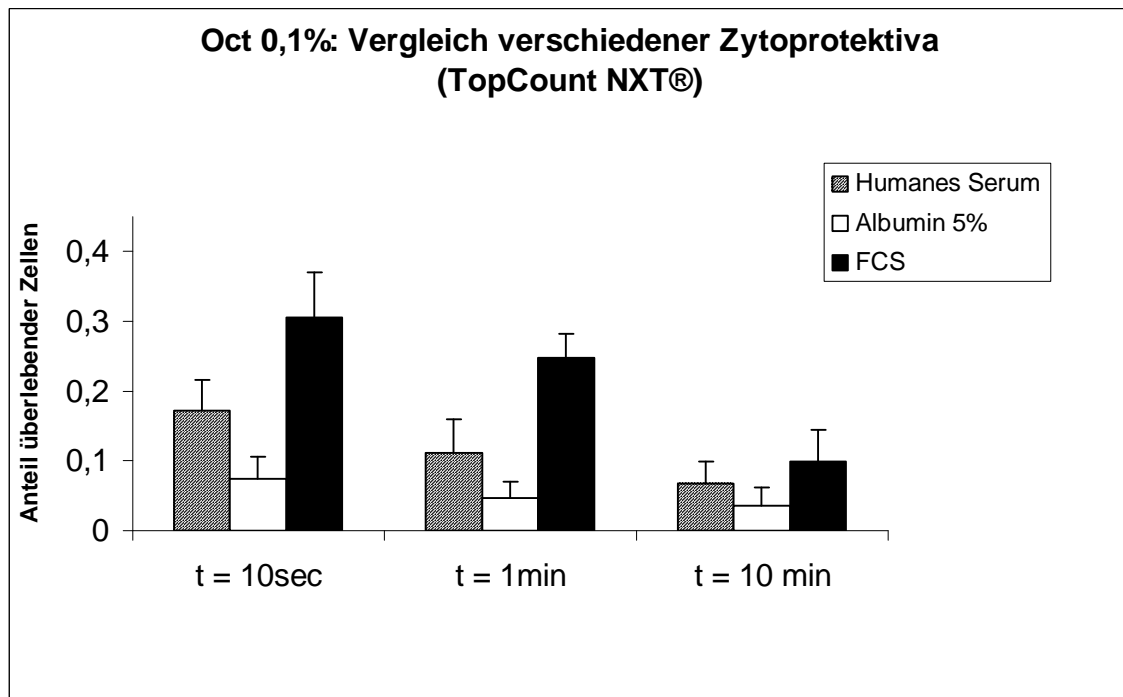


Abb. 13: Anteil überlebender Zellen nach verschiedenen Zeiten bei Zugabe von verschiedenen Zytoprotektiva (TopCount NXT®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1%

Nach dem Einwirken von $t = 10$ sec konnte bei den Anteilen überlebender Zellen zwischen FCS (0,306), Albumin 5% (0,074) und Humanem Serum (0,172) untereinander ein signifikanter Unterschied festgestellt (p jeweils = 0) werden. Bei $t = 1$ min konnte bei den Anteilen überlebender Zellen ebenfalls zwischen allen Substanzen untereinander, nämlich: FCS (0,247), Albumin 5% (0,046) und Humanem Serum (0,111) ein signifikanter Unterschied gemessen werden, wobei der p -Wert jeweils $p = 0$ ist.

Auch nach der Einwirkzeit von $t = 10$ min wurde zwischen FCS (**0,099**) und Albumin 5% (**0,036**) ein signifikanter Unterschied ($p = 0,031$) gemessen. Zwischen Albumin 5% (**0,036**) und Humanem Serum (**0,068**) und FCS und Humanem Serum war der Unterschied (p-Wert jeweils: $p = 0$) bei den Anteilen überlebender Zellen ebenso signifikant (**Abb. 13**).

Bei Einsatz von Octenidindihydrochlorid 0,1% ist nach den gemessenen Zeiten FCS, gefolgt von Humanem Serum, das Zytoprotektivum mit dem größten zellschützenden Potential. Albuminlösung 5% ist von den drei untersuchten Zytoprotektiva jenes mit dem schwächsten zytoprotektiven Potential.

3.1.4.2 Vergleich bei Chlorhexidindigluconat 1,0%

Nach der Untersuchung von Octenidindihydrochlorid 0,1% wurden bei 15 μ l der verschiedenen Zytoprotektiva FCS, Humanes Serum und Albumin 5% mit 10 μ l Chlorhexidindigluconat 1,0% in 8 bis 24 voneinander unabhängigen Messungen in **Abb. 14** dargestellte Überlebensraten der HaCaT-Zellen festgestellt. Die Einwirkzeiten des Antiseptikums waren 10 Sekunden, 1 Minute und 10 Minuten.

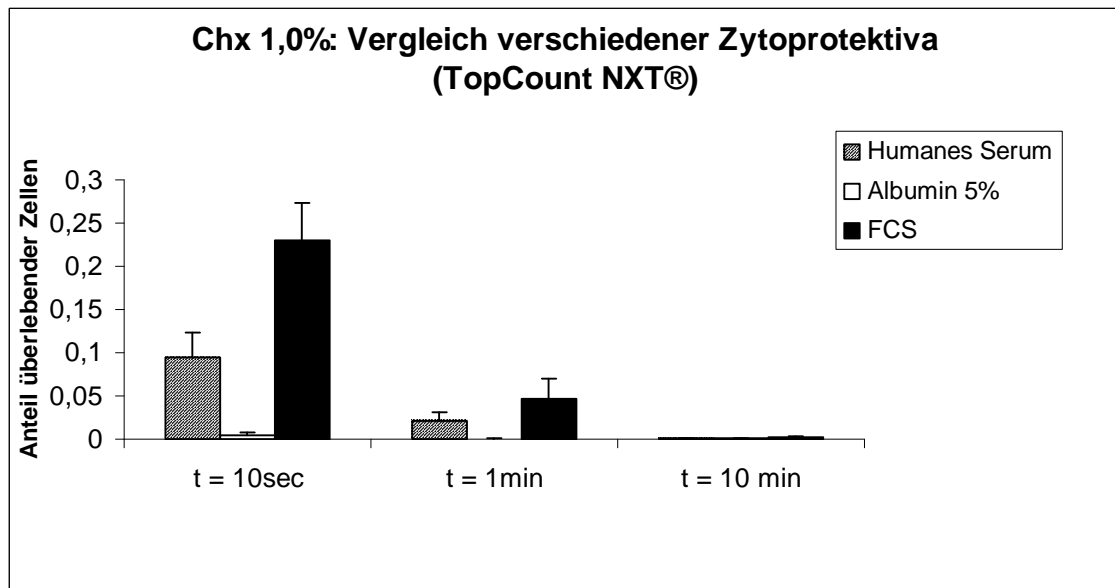


Abb. 14: Anteil überlebender Zellen nach verschiedenen Zeiten bei Zugabe von verschiedenen Zytoprotektiva (TopCount NXT®) mit Chlorhexidindigluconat 0,1%

Bei $t = 10$ sec konnte bei den Anteilen überlebender Zellen bei Gabe der Zytoprotektiva FCS (**0,230**), Albumin 5% (**0,005**) und Humanem Serum (**0,095**) untereinander mit p jeweils = 0 ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt ($t = 10$ sec) hatte FCS, gefolgt vom Humanem Serum den stärksten zytoprotektiven Effekt. Albumin 5% war am schwächsten zytoprotektiv wirksam.

Nach einminütigem Einwirken konnte bei allen Anteilen überlebender Zellen zwischen Albumin 5% (**0,001**) und FCS (**0,047**), $p = 0$, und Albumin 5% und Humanem Serum (**0,021**), $p = 0$, ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Auch der Vergleich von Albumin 5% und Humanem Serum zeigt mit $p = 0,008$ eine Signifikanz.

Nach der Einwirkzeit von $t = 10$ min sind die Werte verschwindend gering und es konnte nur zwischen FCS (**0,002**) und Albumin 5% (**0,001**) mit $p = 0,043$ nicht aber zwischen Fötalem Kälberserum und Humanem Serum (**0,001**), $p = 0,654$, sowie Albumin 5% und Fötalem Kälberserum mit $p = 0,054$ ein signifikanter Unterschied bei den Anteilen der überlebenden Zellen festgestellt werden (**Abb. 14**).

Ähnlich wie bei dem Antiseptikum Octenidindihydrochlorid 0,1% ist nach 10 Sekunden und nach 1 Minute FCS das Zytoprotektivum mit dem stärksten Effekt.

Humanes Serum hat nach beiden Einwirkzeiten auch einen zellschützenden Effekt. Albuminlösung 5% hat beim Einsatz des Antiseptikums Chlorhexidindigluconat 1,0% sowohl nach 10 Sekunden, als auch nach 1 Minute und 10 Minuten keinen zytoprotektiven Effekt. Nach $t = 10 \text{ min}$ ist auch bei Humanem Serum und FCS der positive Effekt auf die HaCaT-Zellen erschöpft.

3.2. Ergebnisse und Methodenentwicklung der Durchflusszytometrie (FACS)

Zunächst galt es, im Vortest die optimale Zellzahl für die Versuche herauszufinden. Der Hersteller gibt an, 10^6 Zellen pro Röhrchen zu verwenden, was sich in der Praxis allerdings als wenig tauglich erwies. Es ist wichtig, dass maximal 300 Ereignisse/Sekunde durch das Messgerät FACS Calibur® erfasst werden, was aber bei dieser hohen Zellzahl nicht möglich war. Deshalb fiel die Wahl darauf, 500.000 Zellen pro Röhrchen zu verwenden. Ein weiteres Problem war, dass es vor allem beim Zusatz des Antiseptikums Chlorhexidindigluconat 1% zu Verklumpungen des Antiseptikums mit dem Zytoprotektivum kam, was eine Messung sehr erschwerte. Für eine Messung mit dem Messgerät FACS Calibur® müssen die zu messenden Zellen vollständig gelöst sein, da sonst die Saugeinrichtung des Geräts verstopfen kann. Die Verklumpungen ließen sich nach der Einwirkzeit durch vorsichtiges Absaugen mit der Absaugpumpe Laboport® gut entfernen. Um nicht eventuell noch vorhandene Reste der Zytoprotektiva mitzumessen, konnte bei dem Programm CellQuestPro® ein so genanntes „Gate“ eingestellt werden, in dem man nur Zellen mit bestimmten Eigenschaften, also in diesem Fall die HaCaT-Zellen, und nicht etwa Proteinreste, erfasst. Bei der Ergebnisauswertung gab es häufig Überlappungen der Dualparameter von apoptotischen und nekrotischen Zellen, nur die lebenden „normalen“ Zellen waren eindeutig identifizierbar. Insofern wurde nur zwischen lebenden und toten HaCaT-Zellen unterschieden, was um den Anteil überlebender Zellen zu ermitteln völlig ausreichend war. Alle nachfolgend dargestellten Anteile überlebender Zellen sind gegenüber 1 ml PBS-Lösung als Blindwert gemessen worden.

3.2.1 Albumin 5% als Zytoprotektivum

Durchflusszytometrisch konnten in 3 bis 6 voneinander unabhängigen Messungen bei Zugabe von 1 ml des Zytoprotektivums Albumin-5% nachfolgende Anteile (**Abb. 15**) überlebender HaCaT-Zellen bei dem Antiseptikaeinsatz von 1 ml Octenidindihydrochlorid 0,1%, 1 ml Chlorhexidindigluconat 1,0%, 1 ml Lavasept® 0,1% und 1 ml Lavasept® 0,2% gemessen werden:

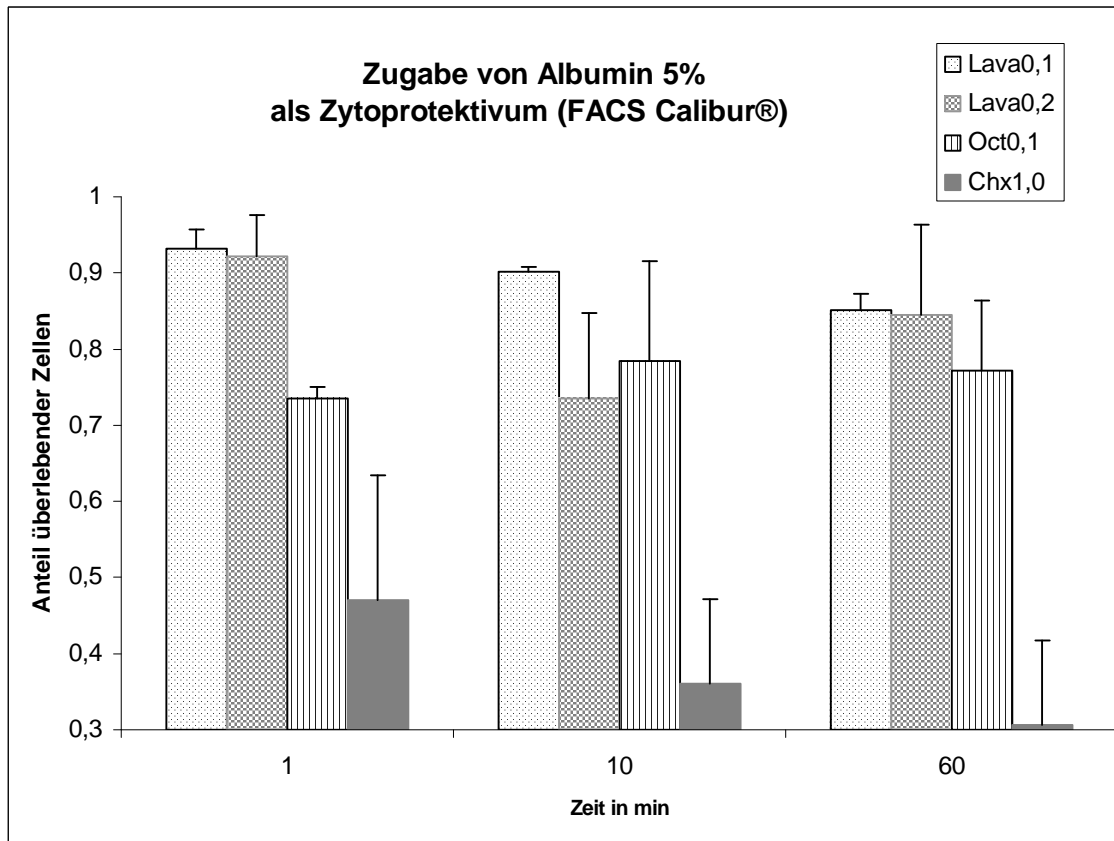


Abb. 15: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von Albumin 5% als Zytoprotektivum (FACS Calibur®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1%, Chlorhexidindigluconat 1,0%, Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2%

Bei $t = 1$ min konnte zwischen Lavasept® 0,1% (**0,931**) und 0,2% (**0,922**) bei einem p-Wert von $p = 0,799$ kein signifikanter Unterschied in den Anteilen der überlebenden Zellen gemessen werden. Zwischen den beiden Lavasept®-Konzentrationen 0,1% und 0,2% und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,736**) konnte mit $p(\text{Lavasept® } 0,1\%) = 0,001$ und $p(\text{Lavasept® } 0,2\%) = 0,028$ eine Signifikanz ermittelt werden. Auch gegenüber Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,471**) war sowohl für Lavasept® 0,1% ($p = 0,001$) und Lavasept® 0,2 ($p = 0$) ein signifikanter Unterschied in dem Anteil überlebender Zellen feststellbar. Zwischen Octenidindihydrochlorid 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0% konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p = 0,011$) in dem Überlebensanteil der Zellen festgestellt werden.

Nach der Einwirkzeit von $t = 10$ min konnte zwischen Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,361**) und den anderen drei Antiseptika, nämlich Lavasept® 0,1% (**0,902**), Lavasept® 0,2% (**0,735**) und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,784**) ein signifikanter Unterschied mit nachfolgenden p-Werten: $p(\text{Lavasept® } 0,1\%) = 0$, $p(\text{Lavasept® } 0,2\%) = 0,010$ und $p(\text{Octenidindihydrochlorid } 0,1\%) = 0$ im Überlebensanteil der Zellen

festgestellt werden. Eine Signifikanz ($p = 0,123$) konnte allerdings nicht zwischen den Messungen mit 1 ml Lavasept® 0,1% (**0,902**) und 1 ml Lavasept® 0,2% (**0,735**) bei Anwesenheit von 1 ml Albumin 5% ermittelt werden. Auch zwischen der 0,1%-igen Lavasept®-Lösung und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,784**) war bei einem p-Wert von $p = 0,080$ keine Signifikanz im Anteil der Zellüberlebensraten zu verzeichnen. Die beiden Antiseptika Lavasept® 0,2% und Octenidindihydrochlorid 0,1% zeigen bei $t = 10$ min ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Der p-Wert beträgt: $p = 0,584$.

Die Messergebnisse nach $t = 60$ min zeigten zwischen Lavasept® 0,1% (**0,851**) und Lavasept® 0,2% (**0,845**) keine Signifikanz ($p = 0,939$). Auch beim Vergleich von Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,772**) mit den Ergebnissen der Messungen der 0,1%-igen und der 0,2%-igen Lösung Lavasept® wurde keine Signifikanz ($p(\text{Lavasept® } 0,1\%) = 0,089$ und $p(\text{Lavasept® } 0,2\%) = 0,416$) in den Überlebensraten festgestellt. Bei dem Einsatz von 1 ml des Antiseptikums Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,306**) konnte sowohl im Vergleich mit Lavasept® 0,1% ($p=0,014$), als auch im Vergleich mit Lavasept® 0,2% (0,004) und Octenidindihydrochlorid 0,1% ($p = 0,008$) nach 60 Minuten Einwirkzeit eine Signifikanz ermittelt werden.

Zusammenfassend lässt sich für die durchflusszytometrische Untersuchung der Antiseptika bei Anwesenheit von 1 ml des Zytoprotektivums Albumin 5% sagen, dass die Überlebensraten bei Anwendung von 1 ml Chlorhexidindigluconat 1,0% bei allen gemessenen Einwirkzeiten deutlich am geringsten ist. Beim Vergleich von Lavasept in den Konzentrationen 0,1% und 0,2% untereinander und mit Octenidindihydrochlorid 0,1% zeigt sich lediglich nach einer einminütigen Einwirkzeit eine Signifikanz zwischen Octenidin und Lavasept® 0,1% und 0,2%. Zu den anderen Einwirkzeiten sind diese drei Antiseptika als gleichwertig in ihrem zytotoxischen Potential bei Anwesenheit von Albumin 5% einzustufen. Über die verschiedenen Einwirkzeiten nimmt die Zahl überlebender Zellen bei Chlorhexidindigluconateinsatz ab. Bei Octenidindihydrochlorid ist der Anteil überlebender Zellen nach 1, 10 und 60 Minuten stabil. Auch bei den beiden Lavasept®-Konzentrationen zeigt sich ein nach 60 Minuten stabiles Niveau der überlebenden Zellen.

3.2.2 Humanes Serum als Zytoprotektivum

Nachdem der zytoprotektive Effekt Humanen Serums bei Einsatz der vier verschiedenen antiseptischen Lösungen vorher schon durch die Lumiszenzmessung mit dem TopCount NXT® gemessen worden war, wurde mit der durchflusszytometrischen Methode mit dem FACS Calibur®-Messgerät in wiederum 3 bis 6 Versuchen, die voneinander unabhängigen waren, bei 1 ml Zusatz von Humanem Serum als Zytoprotektivum untenstehende Anteile (**Abb. 16**) überlebender HaCaT-Zellen mit Antiseptikazusatz von jeweils 1 ml Octenidindihydrochlorid 0,1%, 1 ml Chlorhexidindigluconat 1,0%, 1 ml Lavasept® 0,1% und 1 ml Lavasept® 0,2% ermittelt. Auch bei diesen Versuchen wurden die Anteile überlebender Zellen nach 1 Minute, 10 Minuten und 60 Minuten bestimmt.

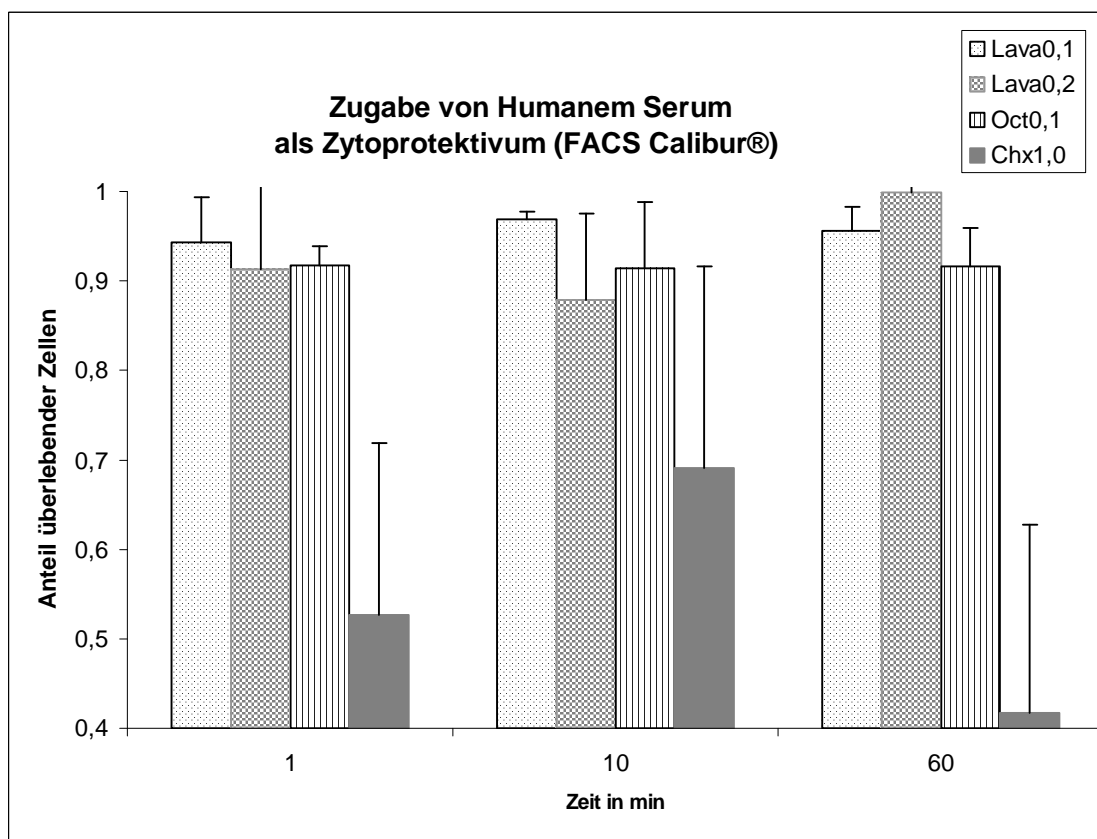


Abb. 16: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von Humanem Serum als Zytoprotektivum (FACS Calibur®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1%, Chlorhexidindigluconat 1,0%, Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2%

Nach einer einminütigen Einwirkzeit konnte zwischen Lavasept® 0,1% (**0,943**) und Lavasept 0,2% (**0,913**) bei einem p-Wert von 0,433 keine Signifikanz im Unterschied der Überlebensraten bei gleichzeitiger Anwesenheit von 1 ml Humanem Serum ermittelt werden. Zwischen diesen beiden Lavasept®-Konzentrationen und Octenidindihydrochloridlösung 0,1% (**0,914**) konnte nach der gleichen Einwirkzeit ebenfalls

keine Signifikanz ($p(\text{Lavasept® } 0,1\%) = 0,489$ und $p(\text{Lavasept® } 0,2\%) = 0,761$) festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der Zellen konnte wohl aber zwischen den drei erstgenannten Antiseptika und Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,527**) gezeigt werden. Die p-Werte waren für Lavasept® 0,1% bei $p = 0,003$, für Lavasept® 0,2% bei $p = 0,004$ und für Octenidindihydrochlorid 0,1% bei $p = 0,004$.

Nach der Einwirkzeit von $t = 10$ min konnte zwischen keinen der verwendeten Antiseptika Lavasept® 0,1% (**0,968**), Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,690**), Lavasept® 0,2% (**0,878**) und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,924**) eine Signifikanz im Vergleich der Zellüberlebensraten gezeigt werden. Für den Vergleich von Lavasept® 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0% lag der p-Wert bei $p = 0,051$. Bei den beiden Lavasept®-Konzentrationen wurde ein p-Wert von $p = 0,369$ ermittelt. 0,1%-ige Lavaseptlösung und eine gleichkonzentrierte Octenidindihydrochloridlösung zeigten einen p-Wert von $p = 0,178$. Der Vergleich von Chlorhexidindigluconat 1,0% und Lavasept® 0,2% führte zu $p = 0,191$, der von Chlorhexidindigluconat und Octenidindihydrochlorid zu $p = 0,089$. Schließlich wurden nach zehnminütiger Einwirkzeit Lavasept® 0,2% und Octenidindihydrochlorid 0,1% verglichen, was mit $p = 0,705$ aber ebenfalls keine Signifikanz in den Zellüberlebensraten zeigte.

Nach der Einwirkzeit von $t = 60$ min konnte zwischen den Antiseptika Lavasept® 0,1% (**0,956**) und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,916**) mit einem p-Wert von $p = 0,144$ keine Signifikanz gezeigt werden. Ebenso war im Vergleich zwischen Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2% (**0,999**) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,111$) in der Überlebensrate der Zellen erkennbar. Bei Zugabe von 1 ml Octenidindihydrochlorid 0,1% und 1 ml Lavasept® 0,2% zu 1 ml Humanem Serum als Zytoprotektivum war bei einem p-Wert von $p = 0,005$ ein signifikanter Unterschied in der durchflusszytometrischen Messung der Zellüberlebensraten zu verzeichnen. Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,417**) zeigte gegenüber den drei anderen eingesetzten antiseptischen Lösungen Lavasept® 0,1%, Lavasept® 0,2% und Octenidindihydrochlorid 0,1% einen signifikanten Unterschied im Überlebensanteil der Zellen (**Abb. 16**). Die p-Werte betrugen: $p(\text{Lavasept® } 0,1\%) = 0,002$, $p(\text{Lavasept® } 0,2\%) = 0,001$ und $p(\text{Octenidindihydrochlorid } 0,1\%) = 0,002$.

Zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen von Humanem Serum als Zytoprotektivum mit den vier Antiseptika lässt sich festhalten, dass nach den Einwirkzeiten von einer Minute und einer Stunde Chlorhexidindigluconat 1,0% trotz Anwesenheit eines Zytoprotektivums signifikant stärker zytotoxisch wirkt als

Lavasept® 0,1%, Lavasept® 0,2% und Octenidindihydrochlorid 0,1%. Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen Lavasept®-Lösung in der Konzentration 0,2% und Octenidindihydrochloridlösung in 0,1%-iger Konzentration nach einer 60-minütigen Einwirkzeit. Alle anderen Vergleiche der Zellüberlebensraten bei der Anwendung der unterschiedlichen Antiseptika erwiesen sich als nicht signifikant.

Eine interessante Beobachtung ist, dass im Vergleich zwischen den Überlebensraten nach 1 Minute und nach 60 Minuten das zytotoxische Potential von Lavasept® 0,1%, Lavasept® 0,2% und Octenidindihydrochlorid 0,1% nicht zunimmt, sondern weitgehend konstant bleibt.

3.2.3 Fötales Kälberserum (FCS) als Zytoprotektivum

Nachdem bereits die Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit den vier eingesetzten Antiseptika bei den Zytoprotektiva Albumin 5% und Humanem Serum dargestellt wurden, sind in **Abb. 17** die Ergebnisse mit dem FACS Calibur®-Messgerät mit Fötalem Kälberserum (FCS) dargestellt. Hier wurden in 3 bis 6 voneinander unabhängigen Versuchen bei 1 ml Zusatz des Zytoprotektivums FCS folgende Anteile überlebender HaCat-Zellen mit 1 ml Octenidindihydrochlorid 0,1%, 1 ml Chlorhexidindigluconat 1,0%, 1 ml Lavasept® in den beiden eingesetzten Konzentrationen 0,1% und 0,2% nach den verschiedenen Einwirkzeiten von 1 Minute über 10 Minuten bis 60 Minuten ermittelt werden:

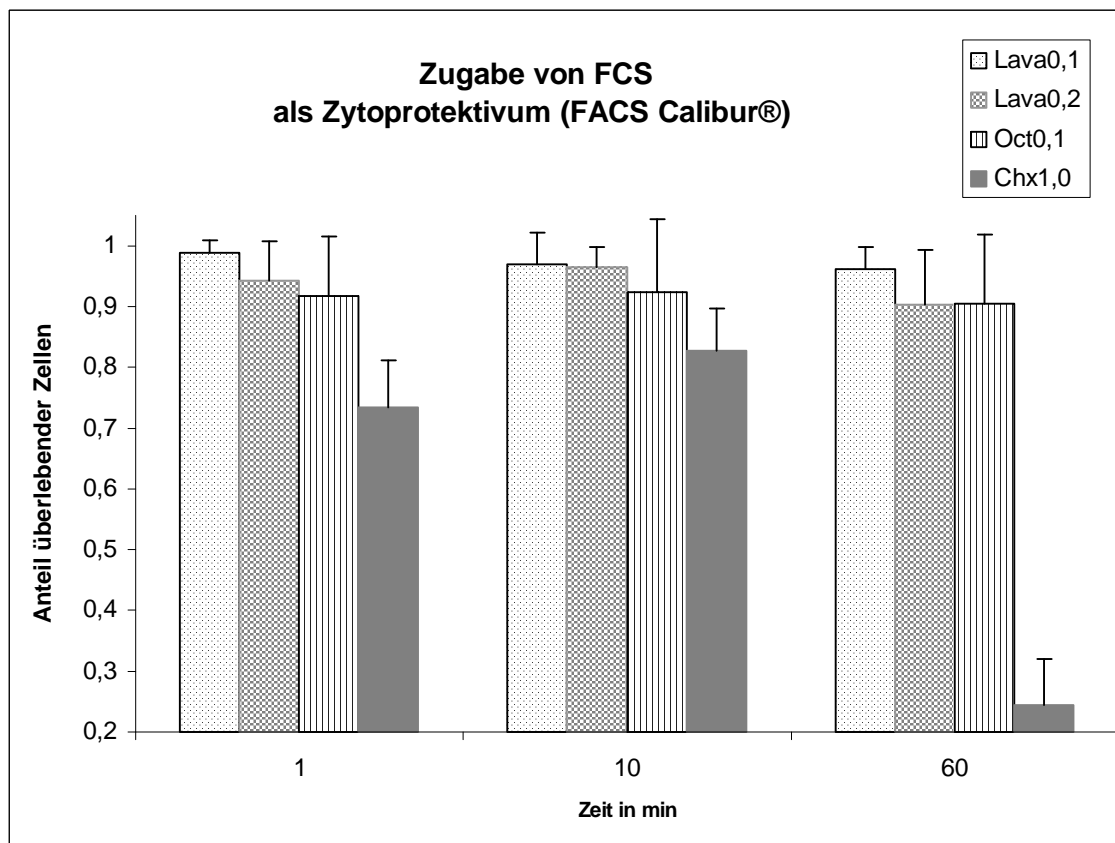


Abb. 17: Anteil überlebender Zellen gegen Zeit [min] bei Zugabe von FCS als Zytoprotektivum (FACS Calibur®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1%, Chlorhexidindigluconat 1,0%, Lavasept 0,1% und Lavasept® 0,2%

Nach dem Einwirken von $t = 1 \text{ min}$ konnte weder zwischen Lavasept® 0,1% (**0,988**) und Lavasept® 0,2% (**0,942**), mit einem p-Wert von $p = 0,369$, noch bei dem Vergleich der Ergebnisse von Lavasept® 0,1% und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,918**), bei einem p-Wert von $p = 0,181$ ein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Nach der einminütigen Einwirkzeit gab es ebenfalls zwischen 1 ml Lavasept® 0,2% und 1 ml

Octenidindihydrochlorid 0,1% keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,684$) im Anteil der überlebenden Zellen. Zwischen den drei genannten antiseptischen Lösungen und Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,733**) zeigte sich eine bei den p-Werten $p(\text{Lavasept® } 0,1\%) = 0,032$, $p(\text{Lavasept® } 0,2\%) = 0,024$ und $p(\text{Octenidindihydrochlorid } 0,1\%) = 0,032$ eine Signifikanz.

Nach der Einwirkzeit von 10 Minuten von jeweils 1 ml Antiseptikum bei Anwesenheit von 1 ml FCS zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied ($p = 0,047$) zwischen Lavasept® 0,1% (**0,970**) und Chlorhexidindigluconat 1,0% (**0,828**). Nach der gleichen Zeit konnte zwischen Lavasept® 0,1% und Lavasept® 0,2% (**0,964**) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,887$) der Zellüberlebensanteile beobachtet werden. Auch zwischen Lavasept 0,1% und Octenidindihydrochlorid (**0,923**) mit der gleichen Konzentration zeigte sich bei einem p-Wert von $p = 0,442$ keine Signifikanz. Beim Vergleich von Lavasept® in 0,2%-iger Konzentration und Octenidindihydrochlorid 0,1% konnte mit einem p-Wert von 0,462 genauso wenig eine Signifikanz im Unterschied der Zellüberlebensanteile festgestellt werden, wie beim Vergleich von Lavasept® 0,2% mit Chlorhexidindigluconat 1,0% ($p = 0,055$). Auch der Octenidindihydrochlorid 0,1%/Chlorhexidindigluconat 1,0%-Vergleich zeigte mit einem p-Wert von $p = 0,177$ keinerlei Signifikanz im Unterschied der Zellüberlebensanteile.

Der Anteil überlebender Zellen wurde ebenfalls nach $t = 60$ min gemessen. Im Vergleich dieser Anteile zwischen Lavasept® 0,1% (**0,962**) und der Lavasept®-Konzentration von 0,2% (**0,903**) konnte mit $p = 0,370$ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Vergleich von Lavasept 0,1% und Octenidindihydrochlorid 0,1% (**0,905**) zeigte nach einer Stunde ebenfalls keine Signifikanz ($p = 0,297$) im Unterschied der Überlebensanteile der HaCaT-Zellen. Die Messungen von 0,2%-iger Lavasept®-Lösung und 0,1%-iger Octenidindihydrochloridlösung ließen nach 60-minütiger Einwirkzeit mit einem p-Wert von $p = 0,985$ keinen signifikanten Unterschied erkennen. Beim Vergleich der Überlebensraten der Zellen von den beiden Lavasept®-Konzentrationen und Octenidindihydrochloridlösung in 0,1%-iger Konzentration mit Chlorhexidindigluconat 1,0% ließ sich eine positive Aussage bezüglich der Signifikanz im Unterschied der Überlebensanteile treffen. Die p-Werte im Vergleich aller drei genannten Lösungen gegenüber der antiseptischen Chlorhexidindigluconatlösung 1,0% (**0,245**), siehe **Abb. 17**, sind allesamt $p = 0$.

Nachdem 1 ml Antiseptikum 1 min bei Anwesenheit von 1 ml Fötalem Kälberserum eingewirkt hatte lagen die Überlebensraten der HaCaT-Zellen bei der Anwendung des Antiseptikums Chlorhexidindigluconat 1,0% deutlich unter denen beim Einsatz der

anderen drei Antiseptika. Lavasept® 0,1% und 0,2% sowie Octenidindihydrochlorid 0,1% sind nach 1 Minute als gleichwertig einzustufen.

Nach zehnminütiger Einwirkzeit unter den gleichen Bedingungen konnte lediglich zwischen Lavasept® 0,1% und Chlorhexidindigluconat 1,0% ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zytotoxizität festgestellt werden. Chlorhexidindigluconat in 1,0%-iger Konzentration ist bei FCS-Anwesenheit signifikant schlechter zellverträglich als 0,1%-ige Lavasept®-Lösung.

60 Minuten nachdem 1 ml Antiseptikum zu den HaCaT-Zellen und 1 ml FCS gegeben wurde, konnte mit der durchflusszytometrischen Messmethode gezeigt werden, dass nach dieser Zeit Chlorhexidindigluconat in 1,0%-iger Konzentration den anderen Antiseptika im Punkt der Zytotoxizität deutlich unterlegen ist. Octenidindihydrochlorid 0,1% und den beiden Lavasept-Konzentrationen 0,1% und 0,2% sind als gleichwertig anzusehen.

3.2.4 Vergleich verschiedener Zytoprotektiva

Nachdem die unterschiedlichen antiseptischen Lösungen bei einem Zytoprotektivum untersucht worden waren und auch deutliche Unterschiede darin festgestellt wurden, ließen sich danach die Ergebnisse der FACS-Versuche dazu nutzen, um das zytoprotektive Potential der eingesetzten Lösungen Albumin 5%, Humanes Serum und Fötales Kälberserum bei der Anwendung der verschiedenen Antiseptika darzustellen und miteinander zu vergleichen

3.2.4.1 Vergleich bei Octenidindihydrochlorid 0,1%

Beim Vergleich der zytoprotektiven Effekte der drei Zytoprotektiva Humanes Serum, Albumin 5% und FCS bei Einsatz des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid 0,1% wurden in 3 bis 6 voneinander unabhängigen Messungen nach den drei verschiedenen Einwirkzeiten $t = 1 \text{ min}$, $t = 10 \text{ min}$ und $t = 60 \text{ min}$ die in **Abb. 18** dargestellten Überlebensraten der HaCaT-Zellen festgestellt:

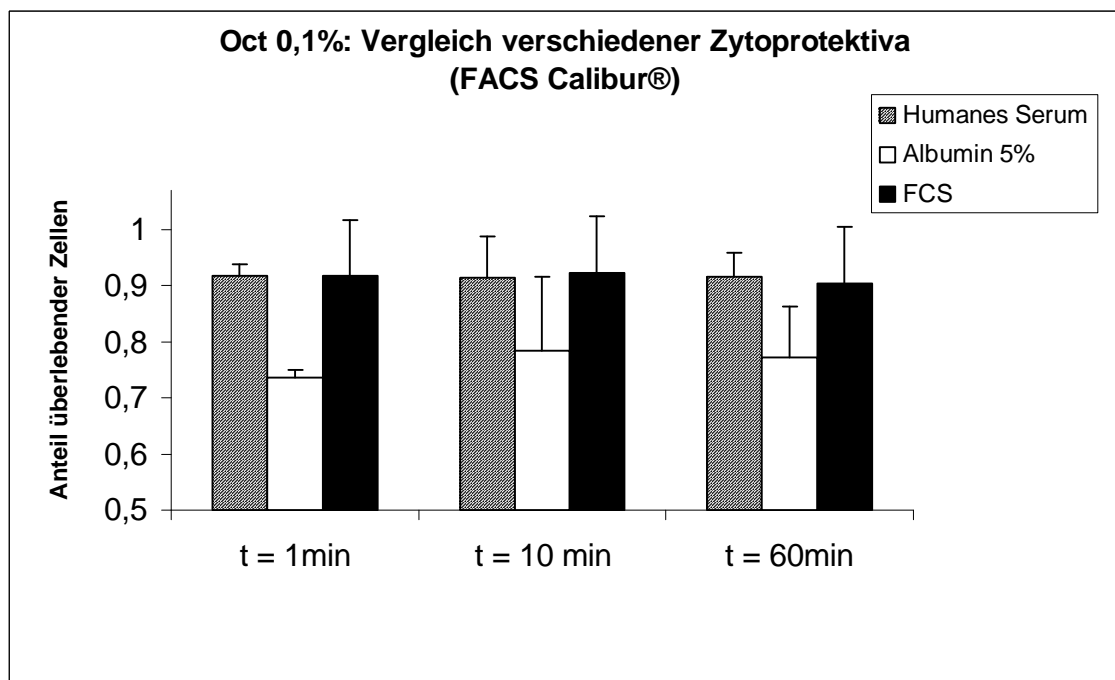


Abb. 18: Anteil überlebender Zellen nach verschiedenen Zeiten bei Zugabe von verschiedenen Zytoprotektiva (FACS Calibur®) mit Octenidindihydrochlorid 0,1%

Nach dem Einwirken von 1 ml Octenidindihydrochlorid 0,1% von $t = 1 \text{ min}$ zeigte sich zwischen Humanem Serum (**0,917**) und FCS (**0,918**) bei einem p-Wert von $p = 0,988$ kein signifikanter Unterschied bei den Anteilen überlebender Zellen. Dagegen ließ sich zum gleichen Zeitpunkt beim Vergleich von Albumin 5% (**0,736**) mit Humanem Serum

($p = 0$) und Fötalem Kälberserum ($p = 0,014$) ein signifikanter Unterschied in den Überlebensraten wahrnehmen.

Nach dem zehnminütigen Einwirken konnte, anders als nach 1 Minute, keine Signifikanz ($p = 0,085$) im Unterschied der Zellüberlebensraten zwischen FCS (**0,923**) und Albumin 5% (**0,784**) festgestellt werden. Auch im Betrachten der Überlebensanteile bei Anwendung von 1 ml Octenidindihydrochlorid 0,1% in Anwesenheit von FCS und Humanem Serum (**0,914**) ließ sich bei einem p-Wert von $p = 0,877$ die Signifikanz nicht feststellen. Der Gegenseitige Vergleich von Albumin 5% und Fötalem Kälberserum (FCS) zeigte diesen Unterschied ebenfalls nicht. Der p-Wert hierfür betrug $p = 0,074$.

Bei $t = 60$ min als Zeit des Einwirkens konnte sowohl zwischen Humanem Serum (**0,917**) und Albumin 5% (**0,772**), bei einem p-Wert von $p = 0,010$, als auch zwischen FCS (**0,905**) und Albumin 5%, bei einem p-Wert von $p = 0,05$, ein signifikanter Unterschied im Überlebensanteil der HaCaT-Zellen festgestellt werden. Diese Signifikanz zeigte sich beim Vergleichen der Messwerte von Humanem Serum und FCS ($p = 0,822$) nicht.

Der Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Zytoprotektiva bei Anwendung des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid 0,1% zeigte nach 1 Minute und nach 10 Minuten eine Signifikanz im Unterschied zwischen Albumin 5% und sowohl dem Humanem-, als auch dem Fötalen Kälberserum. Albumin 5% hat einen schwächeren zellschützenden Effekt als die anderen beiden angewendeten Lösungen. FCS und Humanes Serum sind nach allen Einwirkzeiten bei der durchflusszytometrischen Messung keine Unterschiede erkennbar.

3.2.4.2 Vergleich bei Chlorhexidindigluconat 1,0%

Auch bei Anwendung der 1,0%-igen Chlorhexidindigluconatlösung wurden die durchflusszytometrisch bestimmten Zytotoxizitätsergebnisse der verschiedenen zytoprotektiven Substanzen miteinander verglichen. Bei 3 bis 6 voneinander unabhängigen Versuchen wurden bei 1 ml Chlorhexidindigluconat 1,0%-Zugabe und Anwesenheit von ebenfalls je 1 ml FCS, Albumin 5% oder Humanem Serum in **Abb. 19** graphisch dargestellte Überlebensraten der HaCaT-Zellen gemessen:

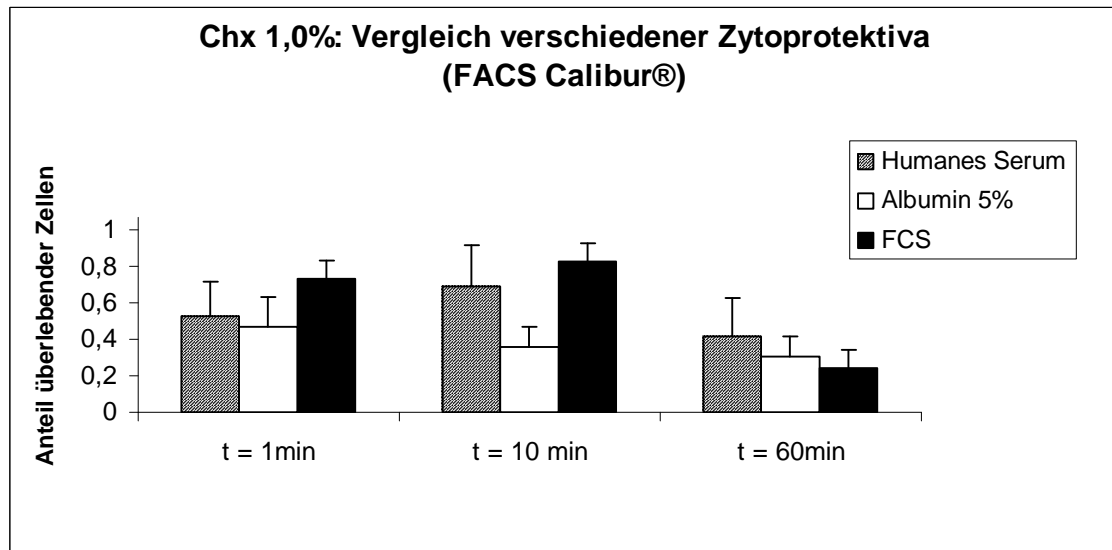


Abb. 19: Anteil überlebender Zellen nach verschiedenen Zeiten bei Zugabe von verschiedenen Zytoprotektiva (FACS Calibur®) mit Chlorhexidindigluconat 0,1%

Nach dem einminütigen Einwirken von 1 ml Chlorhexidindigluconat 1,0% konnte zwischen Humanem Serum (**0,527**) und Albumin 5% (**0,471**) keine Signifikanz ($p = 0,599$) im Unterschied der Zellüberlebensanteile gezeigt werden. Ebenso wenig konnte beim Vergleich der Messungen nach 1 Minute von Humanem Serum und FCS (**0,733**) bei einem p-Wert von $p = 0,056$ eine Signifikanz in den Anteilen der überlebenden Zellen beobachtet werden. Die Signifikanz herrschte allerdings nach der gleichen Einwirkzeit zwischen FCS und Albumin 5% ($p = 0,014$) 10 min nach der Zugabe von Chlorhexidindigluconatlösung in 1,0%iger Konzentration konnte zwischen Humanem Serum (**0,690**) und FCS (**0,828**) keine Signifikanz ($p = 0,263$) im Vergleich der Anteile der überlebenden Zellen festgestellt werden. Der Vergleich von Albumin 5% (**0,361**) mit FCS (**0,828**) zeigte mit dem p-Wert von $p = 0$ einen signifikanten Unterschied. Auch beim Vergleich von Albumin 5% (**0,361**) mit und Humanem Serum (**0,690**) nach zehnminütigem Einwirken konnte der Unterschied der Zellüberlebensanteile als signifikant ($p = 0,026$) eingestuft werden.

Nach $t = 60$ min ließen sich zwischen allen drei Zytoprotektiva keine signifikanten Unterschiede in den Zellüberlebensanteilen feststellen. Humanes Serum (**0,418**) beim Vergleich mit FCS (**0,245**) zeigte bei einem p-Wert von $p = 0,116$ genauso wenig eine Signifikanz, wie der Vergleich von Humanem Serum mit Albumin 5% (**0,306**), $p = 0,334$ und der Vergleich von FCS und Albumin 5% ($p = 0,471$), wie in **Abb. 19** zu sehen ist.

Beim Untersuchen der FACS-Messwerte bei dem Einsatz von 1 ml Chlorhexidindigluconatlösung 1,0% und jeweils 1 ml Zytoprotektivum zeigten sich, dass 5%ige Albuminlösung sowohl nach 1 Minute als auch nach 10 Minuten Fötalem Kälberserum in der Zytoprotektion deutlich unterlegen ist. Eine Unterlegenheit von Albumin 5% kann nach 10 Minuten Einwirkzeit auch gegenüber Humanem Serum beobachtet werden.

3.2.4.3 Vergleich bei Lavasept® 0,1%

Nachdem die drei verwendeten Zytoprotektiva bereits bei Anwendung von Octenidindihydrochlorid 0,1% und Chlorhexidindigluconatlösung 1,0% untersucht wurden, werden in diesem Abschnitt die Ergebnisse der Zytoprotektiva nach Lavasept® 0,1%-Zugabe behandelt. Bei drei voneinander unabhängigen Messungen wurden bei 1 ml Lavasept® 0,1%-Zugabe im Vergleich wiederum 1ml der verschiedenen zytoprotektiven Zusätze die Überlebensraten der HaCaT-Zellen festgestellt, die **Abb. 20** entnommen werden können.

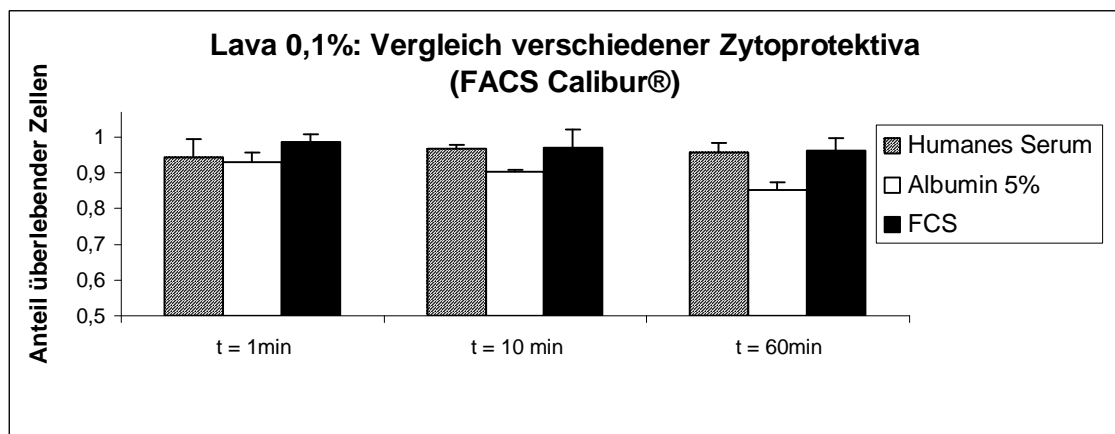


Abb. 20: Anteil überlebender Zellen nach verschiedenen Zeiten bei Zugabe von verschiedenen Zytoprotektiva (FACS Calibur®) mit Lavasept® 0,1%

Nach dem Einwirken von 1 ml Lavasept® 0,1% von t = 1 min zeigte sich zwischen Albumin 5% (**0,931**) und FCS (**0,988**) ein signifikanter Unterschied bei den Anteilen überlebender Zellen. Der p-Wert hierfür beträgt $p = 0,045$. Bei dem Vergleich von Humanem Serum (**0,943**) und Albumin 5% zeigte sich diese Signifikanz ($p = 0,755$) nicht. Genauso war beim Vergleich der Zusätze von Humanem Serum und FCS ($p = 0,254$) keine Signifikanz zu beobachten.

Bei t = 10 min als Einwirkzeit ließ sich zwischen Albumin 5% (**0,902**) und Humanem Serum (**0,968**) eine Signifikanz ($p = 0,002$) beobachten, nicht aber im Vergleich der Messwerte der Zusätze FCS (**0,970**) und Albumin 5%. Hier war der p-Wert 0,153. Auch FCS und Humanes Serum (**0,968**) zeigten im Vergleich untereinander die Signifikanz im Unterschied der Zellüberlebensanteil nicht ($p = 0,963$).

Nachdem 1 ml Lavasept® 0,1% für die Dauer einer Stunde unter Anwesenheit von 1 ml eines Zytoprotektivums eingewirkt hatte, zeigte Albumin 5% (**0,851**) gegenüber FCS (**0,962**) einen signifikanten Unterschied ($p = 0,019$). Unter den gleichen Bedingungen war im Vergleich von Albumin 5% und Humanem Serum (**0,956**) bei einem p-Wert von $p = 0,006$ ebenfalls eine Signifikanz zu beobachten. Auch nach t = 60 Minuten war im

Vergleich der Zytoprotektiva FCS und Humanes Serum untereinander bei einem p-Wert von $p = 0,833$ kein signifikanter Unterschied im Anteil der überlebenden Zellen zu verzeichnen.

Beim Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Zytoprotektiva beim Lavasept®-Einsatz in der 0,1%igen Konzentration des Messgerätes FACS-Calibur® war das Antiseptikum bei Albumin 5% gegenüber Fötalem Kälberserum nach $t = 1$ Minute und $t = 60$ Minute signifikant schlechter zellverträglich. Nach 10 Minuten und 60 Minuten war Lavasept® 0,1% bei Anwesenheit von Albuminlösung in 5%-iger Konzentration signifikant stärker zytotoxisch als bei Humanem Serum als Zytoprotektivum. In der Zytoprotektion der HaCaT-Zellen sind FCS und Humanes Serum gleich gut einzustufen.

3.2.4.4 Vergleich bei Lavasept® 0,2%

Schließlich mussten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsmessungen in Bezug auf die verschiedenen zytoprotektiven Substanzen auch bei Lavasept®-Einsatz in der höheren, 0,2%-igen-Konzentration analysiert werden. Bei drei voneinander unabhängigen Experimenten wurden bei Gabe von 1 ml Lavasept® 0,2% bei 1 ml der verschiedenen zytoprotektiven Zusätze die in **Abb. 20** im Säulendiagramm dargestellten Überlebensraten der HaCaT-Zellen erzielt:

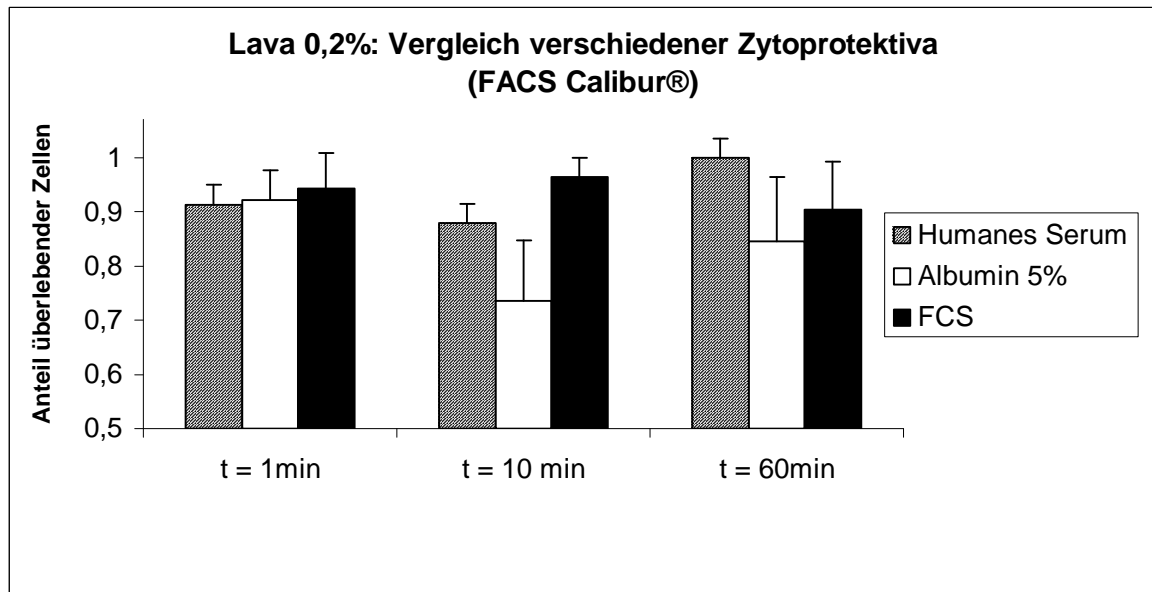


Abb. 21: Anteil überlebender Zellen nach verschiedenen Zeiten bei Zugabe von verschiedenen Zytoprotektiva (FACS Calibur®) mit Lavasept® 0,2%

Nach der Einwirkzeit von Lavasept® 0,2% von 1 min zeigte sich zwischen den verwendeten Zytoprotektiva Humanes Serum (**0,913**) und Albumin 5% (**0,922**) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,814$) im Überlebensanteil der HaCaT-Zellen. Auch konnte zwischen dem menschlichen Serum und dem Fötalen Kälberserum (**0,942**) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,528$) in der Zellüberlebensrate festgestellt werden. Der Vergleich von der Eiweißlösung Albumin 5% und FCS zeigte bei einem p-Wert von $p = 0,697$ ebenfalls keine Signifikanz im Unterschied der Messergebnisse.

Ebenso zeigte sich nach $t = 10$ min beim Vergleich der Zellüberlebensanteile keine Signifikanz ($p = 0,077$) zwischen FCS (**0,964**) und Albumin 5% (**0,735**). Bei den Zusätzen von 1 ml Fötalem Kälberserum und 1 ml Humanem Serum (**0,878**) vor der Anwendung von 1 ml des Antiseptikums war mit dem p-Wert von $p = 0,398$ ebenfalls keine Signifikanz im Unterschied der Überlebensraten zu verzeichnen. Albuminlösung 5% und Humanes Serum zeigten in den Unterschieden der überlebenden Zellen bei

Lavasept-Anwendung in der 0,2%-igen Konzentration nach 10 Minuten genauso keine Signifikanz ($p = 0,231$).

Auch nach $t = 60$ min Einwirkzeit des Antiseptikums gab es keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensrate der Zellen bei den drei eingesetzten Zytoprotektiva; zwischen Humanem Serum (**0,999**) und Albumin 5% (**0,845**) bei einem p-Wert von $p = 0,152$ ebenso wenig, wie zwischen Humanem Serum und FCS (**0,903**) bei $p = 0,203$ und im Vergleich von Albuminlösung 5% und Fötalem Kälberserum ($p = 0,534$).

Beim Lavasept®-Einsatz in der höheren 0,2%-igen Konzentration konnten mit den durchflusszytometrischen Messungen zu keiner der Einwirkzeiten 1 min, 10 min und 60 min ein signifikanter Unterschied der Überlebensanteile der HaCaT-Zellen bei Anwesenheit eines der drei Zytoprotektiva FCS, Albumin 5% und Humanem Serum festgestellt werden.

3.3 Ergebnisse der Versuche zur antimikrobiellen Wirkung

Die Versuche zur antimikrobiellen Wirkung waren notwendig, um zu zeigen, dass die verwendeten Antiseptika trotz der Anwesenheit eines Zytoprotektivums eine ausreichende Wirkung gegen Mikroorganismen besitzen. Die Keimzahlreduktionen werden, wie üblich, in lg-Stufen angegeben.

3.3.1 Antimikrobielle Wirkung von Octenidindihydrochlorid 0,1%

Bei den Versuchen zur antimikrobiellen Wirkung bei Anwesenheit eines Zytoprotektivums wurden nach einer 10-minütigen Einwirkzeit des Antiseptikums Octenidindihydrochlorid 0,1% in zwei voneinander unabhängigen Dreifachbestimmungen folgende Keimzahlreduktionen im Vergleich zur Blindprobe ermittelt, wobei die Ausgangskeimzahl 10^9 KBE/ml betrug:

Zusatz	Keimzahlreduktion (Standardabweichung)
PBS	lg 8,01 (0,14)
Albumin 5%	lg 7,48 (0,36)
FCS	lg 7,75 (0,43)
Humanes Serum	lg 8,07 (0,08)

Bei dem Einsatz von Octenidindihydrochlorid 0,1% liegen die Reduktionen der Ausgangskeimzahl bei den vier verschiedenen Substanzen PBS, Albumin 5%, FCS und Humanem Serum alle zwischen lg 7,48 und lg 8,07.

3.3.2 Antimikrobielle Wirkung von Chlorhexidindigluconat 1,0%

Die Versuche mit Chlorhexidingluconat 1,0% (Einwirkzeit $t = 10$ min), bei denen eine eventuell noch vorhandene antiseptische Wirkung bei Anwesenheit eines Zytoprotektivums nachgewiesen werden sollte, wurden ebenfalls mit einer Ausgangskeimzahl von 10^9 KBE/ml *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Es wurden in zwei voneinander unabhängigen Dreifachbestimmungen im Vergleich zur Blindprobe die Keimzahlreduktionen, die in der untenstehenden Tabelle einzusehen sind, gemessen:

Zusatz	Keimzahlreduktion (Standardabweichung)
PBS	lg 7,84 (0,37)
Albumin 5%	lg 7,48 (0,36)
FCS	lg 7,75 (0,43)
Humanes Serum	lg 8,07 (0,08)

Auch beim Einsatz des Antiseptikum Chlorhexidingluconat 1,0% liegen die Keimzahlreduktionen bei Anwesenheit vier verschiedenen Zusätze mit Werten zwischen lg 7,48 und lg 8,07 in einem engen Bereich zusammen.

3.3.3 Antimikrobielle Wirkung von Lavasept® 0,1%

Bei den Versuchen zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung bei Anwesenheit einer zytoprotektiven Substanz wurden nach einer Einwirkzeit von $t = 10$ min mit Lavasept® 0,1% in zwei voneinander unabhängigen Dreifachbestimmungen folgende Keimzahlreduktionen (Ausgangskeimzahl: 10^9 KBE/ml *Staphylococcus aureus*) bei den vier verschiedenen Zusätzen PBS, Albumin 5%, FCS und Humanes Serum im Vergleich zur Blindprobe ermittelt:

Zusatz	Keimzahlreduktion (Standardabweichung)
PBS	lg 5,05 (0,50)
Albumin 5%	lg 3,76 (1,19)
FCS	lg 4,42 (1,06)
Humanes Serum	lg 4,42 (1,06)

Die Reduktionen der Keimzahl bei der Anwendung dieser antiseptischen Substanz sind im Bereich zwischen lg 5,05 (PBS) und lg 3,76 (Albumin 5%). Mit den einer Keimzahlminderung von jeweils lg 4,42 liegen die Zytoprotektiva FCS und Humanes Serum dazwischen.

3.3.4 Antimikrobielle Wirkung von Lavasept® 0,2%

Die Ergebnisse der Reduktionen der Keimzahl bei der höheren Lavasept®-Konzentration von 0,2% in zwei voneinander unabhängigen Dreifachbestimmungen im Vergleich zur Blindprobe, bei einer Keimzahl vor den Versuchen von jeweils 10^9 KBE/ml *Staphylococcus aureus* und einer Einwirkzeit von $t = 10$ min sind folgende:

Zusatz	Keimzahlreduktion (Standardabweichung)
PBS	lg 7,68 (0,54)
Albumin 5%	lg 5,25 (0,24)
FCS	lg 6,15 (0,04)
Humanes Serum	lg 4,71 (0,74)

Die Keimzahlreduktionen bei PBS-Zusatz ist mit lg 7,68 am höchsten, gefolgt von FCS mit lg 6,15. Die niedrigsten Reduktionen der Ausgangskeimzahl ist bei Albumin 5% mit lg 5,25 und Humanem Serum zu verzeichnen, das einen Wert von lg 4,71 hat.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines Zellmodells verschiedene Antiseptika auf ihre Zytotoxizität bei Anwesenheit von zytoprotektiven Substanzen mittels Durchflusszytometrie und Lumineszenzmessung zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei den getesteten Substanzen Unterschiede in ihrem zytotoxischen Verhalten und ihrer antimikrobiellen Aktivität bei Anwesenheit eines Zytoprotektivums gibt. Die Ergebnisse belegen zudem Unterschiede im zytoprotektiven Effekt der eingesetzten Zytoprotektiva Humanes Serum, 5%-Albuminlösung und FCS.

4.1 Verwendete Methoden

An HaCaT-Zellen ist sowohl die ATP-Messung mittels Lumineszenz [u. a. Hipler, U.C. *et al* 2003 und Wollina, U. *et al* 2005], als auch die durchflusszytometrische Messung mit einem Annexin-V/Propidiumiodid-Gemisch [u. a. Hagenhofer, M. *et al* 1998 und Paixão-Cavalcante, D. *et al* 2006] mehrfach erfolgreich beschrieben worden. Insofern sind beide Methoden als geeignet anzusehen. Bei der ATP-Messung musste während der Versuchsdurchführung auf extreme Sauberkeit geachtet werden, da ATP in der Umwelt überall vorkommt und so durch unsauberes Arbeiten die Ergebnisse stark verfälscht werden können. Auf eine Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit verzichtet.

Es ist allerdings zu bemerken, dass die absoluten Anteile der überlebenden Zellen in beiden Methoden nicht miteinander verglichen werden konnten, da die verwendeten Zellzahlen mit 1.000 Zellen pro Well (TopCount NXT®) und 500.000 Zellen pro Röhrchen (FACS Calibur®) sehr unterschiedlich waren. Somit waren auch die eingesetzten Verhältnisse Antiseptikum/Zytoprotektivum 10µl/15 µl (TopCount NXT®) und 1ml/1ml (FACS Calibur®), ebenfalls sehr unterschiedlich. Trotz der quantitativen Unterschiede in den Versuchsansätzen der beiden verwendeten Methoden zur Zytotoxizitätsmessung ließen sich klare qualitative Aussagen bezüglich der verwendeten Antiseptika und Zytoprotektiva treffen. Die qualitativen Aussagen der Lumineszenzmessung und Durchflusszytometrie deckten sich miteinander, es fällt einzig auf, dass bei den Lumineszenzmessungen eine 0,1%-ige Octenidindihydrochloridlösung im Vergleich zu Lavasept®-Lösungen deutlich schlechtere Zellüberlebensraten erzielt als bei den FACS®-Messungen. Als Illustration seien in nachfolgender Tabelle nach einminütiger Einwirkzeit unter Anwesenheit von Humanem Serum die jeweiligen Überlebensraten bei Verwendung der beiden Methoden verglichen.

Überlebensanteile der HaCaT-Zellen im Vergleich der Methoden bei Zugabe von Humanem Serum		
	TopCount NXT®	FACS Calibur®
Octenidindihydrochl. 0,1%	0,111	0,914
Chlorhexidindigluc. 1,0%	0,021	0,527
Lavasept® 0,1%	0,929	0,943
Lavasept® 0,2%	0,815	0,913

Die Kultivierung der HaCaT-Zellen erwies sich als gut durchführbar. Ihr Wachstum verlief schnell und komplikationslos. Das Anzüchten für die Versuche mit Durchflusszytometrie erforderte hingegen einen sehr viel größeren Maßstab als das Kultivieren der Zellen für die Lumineszenzmessungen.

4.2 Zytotoxizität der verwendeten Antiseptika

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Anwesenheit einer zytoprotektiven Substanz Lavasept® in den beiden Konzentrationen von 0,1% und 0,2% den geringsten zytotoxischen Effekt auf die HaCaT-Zellen hat. Diese Aussage ließ sich sowohl für die Lumineszenzmessung als auch für die Durchflusszytometrie treffen.

Bei Chlorhexidindigluconat in 1,0%-iger Konzentration war bei den beiden verwendeten Methoden der Anteil überlebender Zellen am geringsten. Diese Ergebnisse gelten für alle eingesetzten Zytoprotektiva.

Die drei verwendeten Zytoprotektiva hatten mit 0,1%-Octenidindihydrochloridlösung bei der FACS-Methode einen etwas geringeren zytoprotektiven Effekt als bei Lavasept®. Bei der Lumineszenzmessung war es Lavasept deutlich unterlegen.

Octenidindihydrochlorid 0,1% war Chlorhexidindigluconat 1,0 % in beiden Methoden überlegen.

Um der Frage nach dem Wirkmechanismus der Zytoprotektion nachzugehen, wurden Aufnahmen der eingesetzten 5%-Albuminlösung in einer 1:1 Mischung mit den verschiedenen Antiseptika mit dem Elektronenmikroskop gemacht. Als Vergleichsbild diente eine Aufnahme von reiner 5%-Albuminlösung (**Abb. 22**). Albumin ist sowohl im tierischen als auch im menschlichen Serum das am häufigsten vorkommende Protein. Damit ist es in allen drei verwendeten zytoprotektiven Substanzen Hauptbestandteil.

Sehr heterogene Lösungen, wie humanes Serum oder fötales Kälberserum lassen sich nur schwer elektronenmikroskopisch untersuchen. Deshalb wurden die Aufnahmen auf die 5%-Albuminlösung beschränkt.

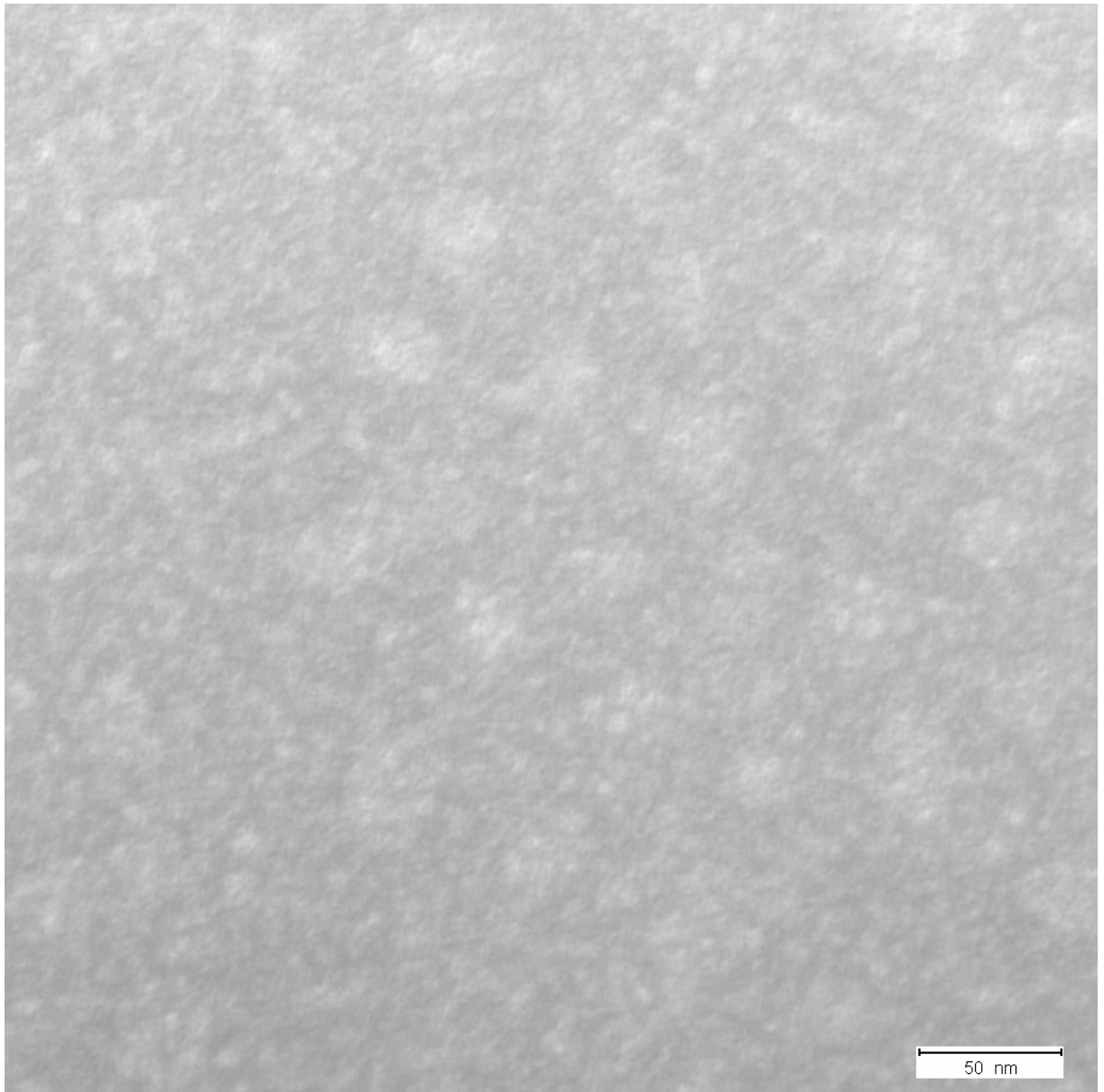


Abb. 22: Albuminlösung 5% in 140.000facher Vergrößerung. (Elektronenmikroskop EM 109 Zeiss , Kontrastmittel Phosphorwolframsäure)

Bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme (**Abb. 22**), bei der lediglich 5%-Albuminlösung abgebildet wurde, konnten erwartungsgemäß nur Albuminmoleküle mit einem Molekülradius von 3,5 nm erkannt werden. Aufgrund der Molekülmasse von 66.248 Da sind die einzelnen Albuminmoleküle zwar sehr klein, aber trotzdem bei dieser Vergrößerung elektronenmikroskopisch darstellbar.

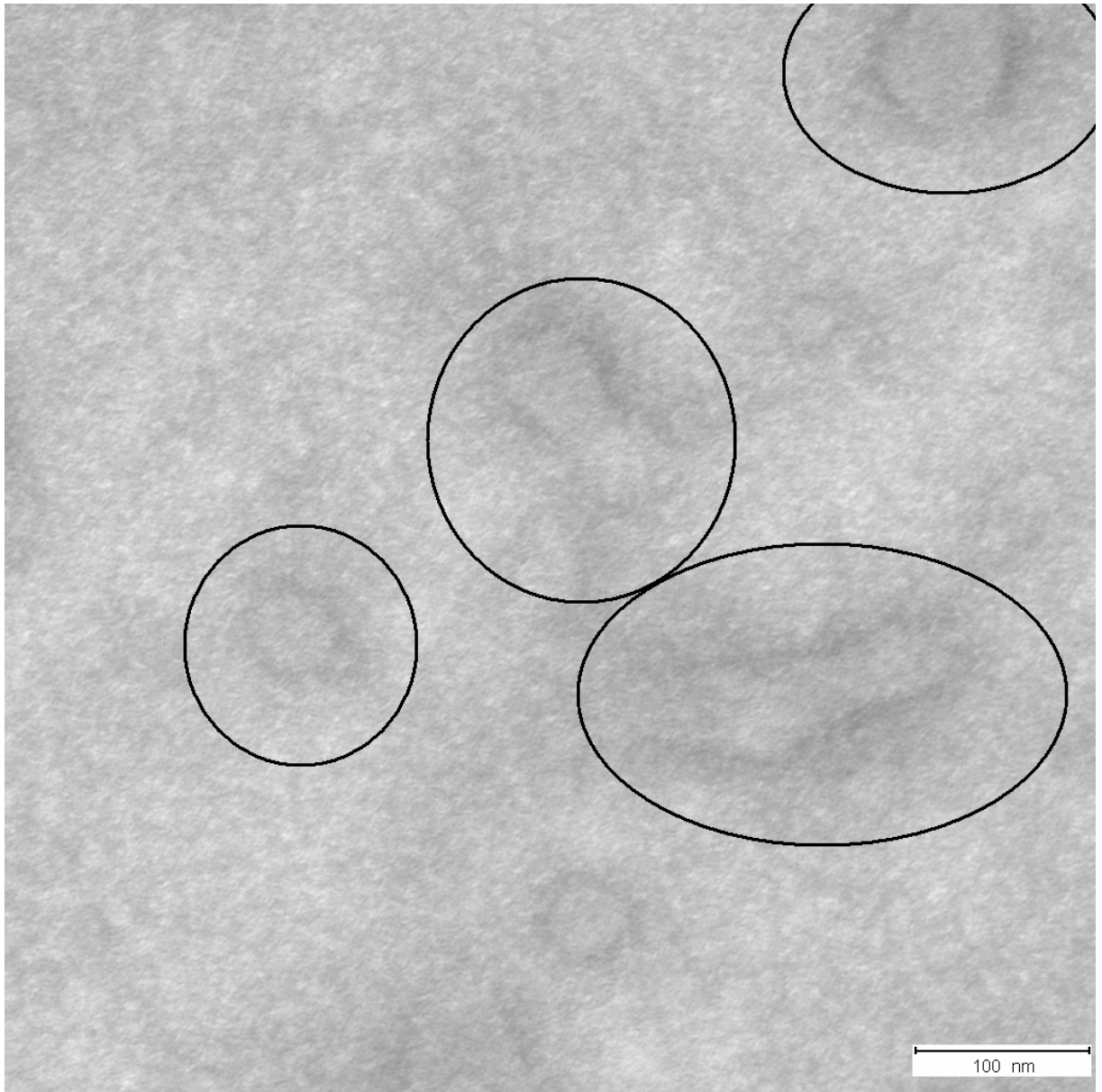


Abb. 23: 1:1 Mischung Albuminlösung 5% und Octendindihydrochloridlösung 0,1%,
Einwirkzeit $t=1$ min (Elektronenmikroskop Zeiss EM 109, 85.000fache Vergrößerung,
Kontrastmittel Phosphorwolframsäure)

Elektronenmikroskopisch (**Abb. 23**) ließen sich Zusammenlagerungen von Albuminmolekülen unter dem Einfluss von Octenidin nachweisen (Albuminlösung 5%, 1:1 versetzt mit 0,1%-iger Octenidindihydrochloridlösung, Einwirkzeit $t=1$ min). Elliptisch markiert sind einige dieser Zusammenlagerungen hervorgehoben. Die Zusammenlagerungen binden bei Erhalt der antimikrobiellen Aktivität einen Teil des eingesetzten Antiseptikums. Dadurch wird die Menge Antiseptikum verringert, die mit den Zellen direkten Kontakt hat. Als Folge wird die Zytotoxizität des Antiseptikums herabgesetzt.

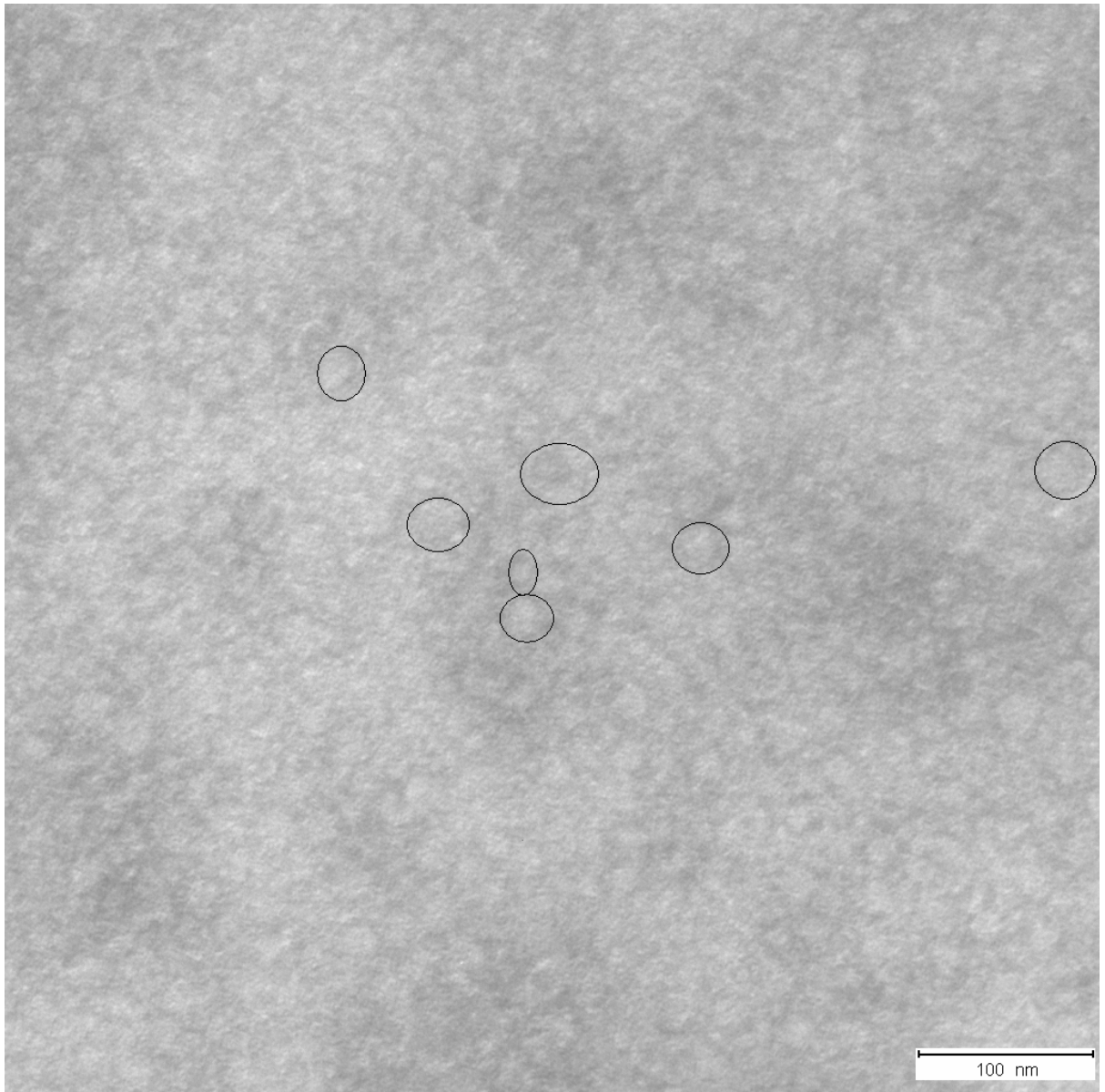


Abb. 24: 1:1 Mischung Albuminlösung 5% und Chlorhexidindigluconatlösung 1,0%
Einwirkzeit: $t=1\text{min}$ (Elektronenmikroskop EM 109, Zeiss, 85.000fache Vergrößerung,
Kontrastmittel: Phosphorwolframsäure)

Bei einer 1:1 Mischung von Albuminlösung 5% und Chlorhexidindigluconatlösung 1,0% (**Abb. 24**) ließen sich die großen Zusammenlagerungen, wie in der vorherigen **Abb. 23** nicht erkennen: Dafür sieht man deutlich kleinere Zusammenlagerungen im Bild, von denen bei einigen eine Markierung eingezeichnet wurde. Der kleine zytoprotektive Effekt von Albumin-5% bei Chlorhexidinanwendung lässt sich durch die Wechselwirkungen zwischen dem Antiseptikum und der Eiweißlösung erklären.

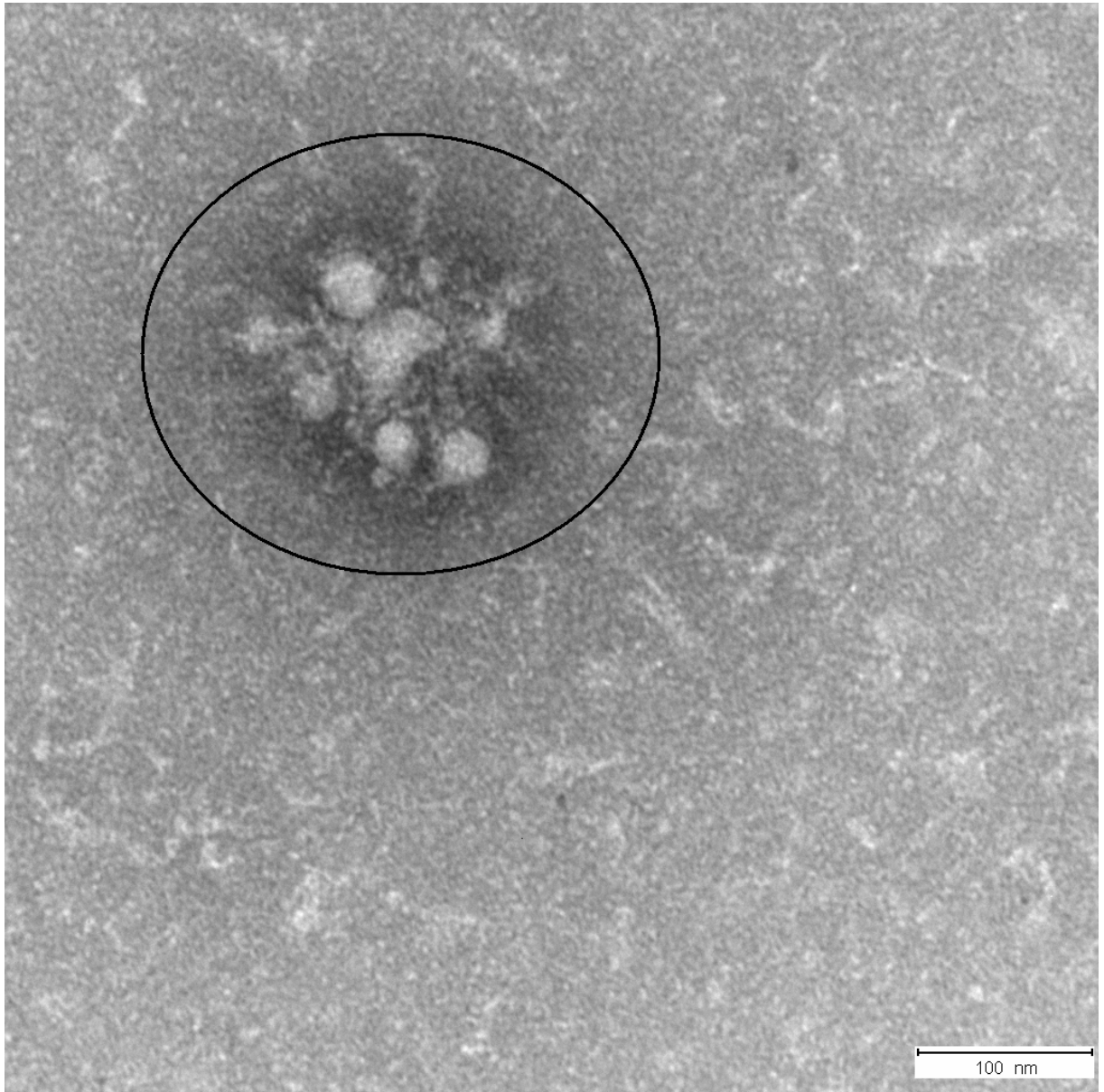


Abb. 25: 1:1 Mischung aus Albuminlösung 5% und Lavasept® 0,1%
Einwirkzeit: $t=1\text{min}$ (Elektronenmikroskop EM 109, Zeiss, 85.000fache Vergrößerung,
Kontrastmittel Phosphorwolframsäure)

Albuminlösung mit Lavasept®-Lösung 0,1% versetzt führt zu einer Komplexierung mehrerer Polyhexanid-Proteinzusammenlagerungen (**Abb. 25**, elliptisch markiert), die in dem elektronenmikroskopischen Bild gut zu erkennen ist. Im Vergleich zu den Octenidin-Albumin-Zusammenlagerungen (**Abb. 23**) war der Antiseptikum-Zell-Kontakt durch die Komplexierung mehrerer Polyhexanid-Albumin-Zusammenlagerungen noch einmal vermindert.

Aufgrund der elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich die These aufstellen, dass der zytoprotektive Effekt der Albuminlösung bei Antiseptikaeinsatz direkt mit der Größe, der Anzahl und der Komplexierung der Zusammenlagerungen untereinander einhergeht.

Lavasept® ist mit der Komplexierung der Protein-Antiseptikum-Zusammenlagerungen das am besten verträgliche Antiseptikum, gefolgt von Octenidindihydrochlorid 0,1 % mit großen Protein-Octenidin-Zusammenlagerungen, die allerdings nicht untereinander komplexiert sind. Bei Chlorhexidindigluconat 1,0% sind nur kleine Zusammenlagerungen im Elektronenmikroskop erkennbar, was auch erklärt, dass der zytoprotektive Effekt des Albumins bei Chlorhexidindigluconateinsatz am geringsten ausfällt. Die elektronenmikroskopischen Bilder erklären die Unterschiede in den Ergebnissen der Zellüberlebensrate der HaCaT-Zellen in den Experimenten. Bei einer 5%-Albuminlösung überleben bei Lavasept®-Zusatz die meisten Zellen, gefolgt von Octenidindihydrochlorid. Die wenigsten Zellen überleben beim Einsatz des Antiseptikums Chlorhexidindigluconat. Qualitativ lassen sich diese Aussagen auf FCS und Humanes Serum übertragen, da in beiden Seren Albumin der Hauptbestandteil ist. Dies wurde durch die Versuche bestätigt.

In der Literatur finden sich weitere Erklärungsansätze für die teils starken Unterschiede zwischen den verschiedenen Antiseptika: Dass Octenidindihydrochlorid 0,1% in beiden Methoden deutlich besser als Chlorhexidindigluconat 1,0% für die HaCaT-Zellen verträglich ist und dennoch antiseptisch wirksam ist, lässt sich folgendermaßen erklären: Es findet eine sogenannte „Versiegelung“ statt. Im Zellmodell bildet Octenidindihydrochlorid stabile Komplexe durch Wechselwirkungen mit Zellen und Proteinen, wobei allerdings die antimikrobielle Aktivität erhalten bleibt [Kramer, A. *et al* 2006]. Dieser Effekt ist bei der *in vivo* Anwendung günstig, da nur die äußerste Zellschicht mit dem Antiseptikum in Kontakt kommt und dieser von dort durch Erhalt der antimikrobiellen Aktivität weiter wirken kann. Eine Hydrolyse von Octenidindihydrochlorid ist nicht möglich, da der Arzneistoff keine Amid-, Ester- oder Säureanhydridstruktur besitzt.

HaCaT-Zellen haben sowohl bei den ATP-Messungen, als auch bei den Annexin-V/PI-Messungen bei Zugabe des Antiseptikums Chlorhexidindigluconat 1,0% den geringsten Anteil überlebender Zellen. Eine Erklärung dafür ist die Entstehung eines Hydrolyseproduktes. Chlorhexidindigluconat kann sich zersetzen, wobei unter Hydrolyse

4-Chloranilin entsteht [Ciarlone, A.E *et al* 1976]. Diese Hydrolyse ist temperatur- und pH-Wert-abhängig [Dolby, J. *et al* 1972]. 4-Chloranilin wurde in Tierversuchen an Ratten und Mäusen untersucht und ist sowohl als toxisch [Chhabra, R.S. *et al* 1990] als auch als karzinogen [Chhabra, R.S. *et al* 1991] einzustufen.

Obwohl sowohl Polyhexanid als auch Chlorhexidindigluconat die gleiche wirksame Biguanidin-Struktur besitzen, unterscheiden sie sich stark in ihrer Zytotoxizität. In den Versuchen war die Überlebensrate der HaCaT-Zellen bei den beiden Lavasept®-Konzentrationen 0,1% und 0,2% signifikant höher als die bei Clorhexidindigluconat 1,0%. Im Unterschied zu Clorhexidindigluconat können bei Polyhexanid keine zytotoxischen Chlorphenylreste, wie z. B. 4-Chloranilin (s.o.) entstehen.

Polyhexanid hat einen selektiven Wirkmechanismus. Als kationisch geladenes Biguanid hat Polyhexanid eine hohe Affinität zur negativ geladenen Bakterienoberfläche. Dadurch werden die inneren Membranen der Bakterien zerstört. Es kommt zum Austreten der zytoplasmatischen Bestandteile und schließlich zur Denaturierung der Proteine und zum Absterben der Bakterienzelle [Schäfer, G *et* Rieger, E. 1974]. Dieses Verhalten dient beim Menschen als Erklärung für die sehr gute Gewebeverträglichkeit von Ployhexanid. Der Arzneitoff wirkt sehr stark auf die sauren Phospholipide der bakteriellen Zellmembran und nur sehr schwach auf die Phospholipide humaner Zellmembranen, die neutral sind [Ikeda, T. *et al* 1983]. Aufgrund seiner Molekülgröße kann man davon ausgehen, dass Polyhexanid nur lokal wirkt und nicht resorbiert wird. Im Vergleich zu Octenidindihydrochlorid zeigte Lavasept® vor allem bei den ATP-Messungen deutliche Vorteile in der Zytotoxizität. Diese Unterschiede in der Zytotoxizität sind beschrieben [Kramer, A. *et al* 1998].

Kürzlich wurden Fälle bekannt, nach denen es bei nicht bestimmungsgemäßer Anwendung von Octenisept®-Lösung zu Ödemen und Gewebsnekrosen kam. In diesen Fällen wurden die Stichkanäle von Stichverletzungen im Handbereich unter Druck mit der Octenisept®-Lösung behandelt; außerdem war ein Abfließen des Präparates nicht möglich. Der Warnhinweis des Herstellers, dass Octenisept nicht unter Druck in das Gewebe eingebracht werden darf, und dass Abfließen ermöglicht werden muss, wurde nicht beachtet. Die in Wundgeweben zurückbleibenden Mengen des Antiseptikums waren für diese Reaktionen verantwortlich [Oltmans, P. und Siebert, J. 2009]. Wenn diese Nebenwirkungen bei bestimmungsgemäßigem Gebrauch auch nicht vorkommen, sprechen sie dennoch für das nicht zu unterschätzende zytotoxische Potenzial der

Substanz. Solche Effekte wurden auch bei längerfristiger Lavasept®-Anwendung bisher nicht beschrieben.

Auch *in vivo* gibt es den gleichen Effekt: Bei Versuchen an Schweinen zeigte Polyhexanid gegenüber Octenidindihydrochlorid und Placebo eine beschleunigte Wundheilung, indem die Kontraktion der Wunde schneller ablief [Kramer, A. *et al* 2004(2)]. Beim Menschen inhibiert Polyhexanid im Gegensatz zu Povidon-Iod und Silbernitrat nicht den Reepithelisierungsprozess bei schlecht heilenden Dekubitus-Ulzera und Verbrennungen 2.Grades [Däschlein, G. *et al* 2007].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gerade bei einem längerfristigen Einsatz Polyhexanid Mittel der Wahl bezüglich Zytotoxizität und antimikrobiellem Spektrum ist. Nachteilig in der Akutbehandlung im Vergleich Octenisept® ist die verlängerte minimale Einwirkzeit von 2-5 Minuten gegenüber 30 Sekunden.

4.3 Verwendete Zytoprotektiva

Mit beiden Methoden konnte die Zytoprotektivität von Albuminlösung 5%, Humanem Serum und Fötalem Kälberserum gezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt des Zytoprotektivums und dessen zytoprotektivem Effekt konnte ermittelt werden. Bei nahezu allen Untersuchungen war der Anteil überlebender Zellen bei Albumin 5%-Anwesenheit deutlich geringer als der Anteil überlebender Zellen bei Anwesenheit von Humanem Serum. Der Vergleich wiederum dieser beiden Substanzen mit Fötalem Kälberserum (FCS) untermauerte dies, von Ausnahmen abgesehen. Die Unterschiede im zytoprotektiven Effekt sind bei der durchflusszytometrischen Messung von Octenidindihydrochlorid 0,1% zwischen Humanem Serum und Fötalem Kälberserum nicht zu sehen (siehe **Abb. 19**). FCS ist durch seinen hohen Gehalt an BSA die eiweißreichste Zugabe. FCS, das in menschlichen Organismus gar nicht vorkommt, wurde aufgrund seines hohen Proteingehaltes bei den Versuchen eingesetzt, da diese Schlussfolgerung zu erwarten war.

Damit ließ sich die Hypothese aufstellen, je höher der Proteinanteil in einer Wunde, desto weniger wird das Gewebe durch eine antiseptische Wundbehandlung in Mitleidenschaft gezogen. Die Diskrepanzen zwischen den *in vitro* und *in vivo* Studien zur Zytotoxizität von antiseptischen Arzneistoffen ließen sich dadurch erklären, dass Proteine mit den Antiseptika Zusammenlagerungen und Komplexe bildeten. Bei Erhalt der anti-mikrobiellen Wirksamkeit wurden durch die Serumproteine ein Teil der zytotoxischen Wirkstoffe abgefangen und somit unschädlich gemacht.

4.4 Antimikrobielle Wirkung bei Zytoprotektivaanwesenheit

Nachdem Pitten und Mitarbeiter die antimikrobielle Wirkung diverser Antiseptika bei Anwesenheit verschiedener Zusatzstoffe wie Albumin 10% oder Schafblut 10% untersucht hatten [Pitten, F.A. *et al* 2003], war es wichtig zu zeigen, dass die angewendeten Antiseptika auch bei Zytoprotektivaanwesenheit wirken. Ohne „organische“ Zusätze ist nach 10 min eine Reduktion von mindestens 5 log-Stufen gefordert [EN 1040], mit diesen Zusätzen wird eine log-Reduktion von 3 Stufen als geeignet angesehen [Pitten, F.A. *et al* 2003]. Insofern erfüllen alle vier eingesetzten Antiseptika diese Anforderungen. Chlorhexidindigluconatlösung 1,0% und Octenidindihydrochlorid 0,1% erreichten bei allen verwendeten Zytoprotektiva Reduktionsraten von durchweg mindestens 7 log-Stufen.

Die Keimzahlreduktionen bei den beiden Lavasapt®-Konzentrationen von 0,1 % und 0,2 % lagen teils deutlich darunter, wobei erwartungsgemäß bei der niedrigeren Konzentration von 0,1% mehr Bakterien den Antiseptikaeinsatz überleben; hier wurden auch Werte unter 5 log₁₀-Stufen gemessen. Allerdings liegen sie auch deutlich über der geforderten Keimzahlreduktion bei Zytoprotektivaanwesenheit von 3 log-Stufen.

5. Zusammenfassung

Antiseptische Agenzien werden in der Wundbehandlung breit eingesetzt. Neben der antimikrobiellen Aktivität ist die Gewebeverträglichkeit eine der Grundvoraussetzungen für die Auswahl eines geeigneten Wirkstoffs. Zu der *in vitro* Toxizität der einzelnen Stoffe gibt es zahlreiche Untersuchungen, auch die *in vivo* Toxizität muss im Rahmen einer Zulassung als Arzneimittel durch Tierversuche untersucht werden. Zwischen *in vivo* und *in vitro* Werten gibt es erhebliche Differenzen. Antiseptische Arzneistoffe sind in der Regel *in vivo* deutlich besser verträglich. Die vorliegende Arbeit ging daher anhand eines Zellmodells der Frage nach, worauf diese Diskrepanzen beruhen. Untersucht wurden die gängigen und weit verbreiteten Antiseptika. Octenidindihydrochloridlösung in 0,1%iger Konzentration, Chlorhexidindigluconatlösung in 1,0%iger Konzentration und Lavasept®-Lösung, die den Wirkstoff Polyhexanid enthält, in 0,1%iger und 0,2%iger Konzentration. Alle Konzentrationen sind handelsüblich.

Um eine Wunde zu simulieren wurden immortalisierte Keratinozyten (HaCaT-Zellen) verwendet. Außerdem wurden mit Albuminlösung 5%, Humanem Serum und Fötalem Kälberserum Zusätze verwendet, bei denen ein zytoprotektiver Effekt zu erwarten war. Mit den Methoden der ATP-Messung durch Lumineszenz und der Durchflusszytometrie (FACS) wurde die Zytotoxizität der einzelnen Substanzen bei Anwesenheit eines Zytoprotektivums untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob ein antimikrobieller Effekt weiterhin vorhanden war.

Durch beide Methoden der Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde gezeigt, dass es bei Zytoprotektivaanwesenheit Unterschiede in der Zytotoxizität der verwendeten Substanzen, aber auch Unterschiede zwischen den einzelnen Zytoprotektiva gab.

Bei der ATP-Messung der überlebenden HaCaT-Zellen lag die Überlebensrate der Zellen bei Octenidindihydrochloridlösung 0,1% bei allen drei verwendeten Zusätzen und den verschiedenen Einwirkzeiten deutlich höher als bei Chlorhexidindigluconatlösung 1,0%. Die beiden Lavasept®-Konzentrationen, die nur bei Humanem Serum zum Einsatz kamen, waren besser zellverträglich als die beiden anderen Antiseptika. Beim Vergleich der Zytoprotektiva untereinander war der zytoprotektive Effekt des Fötalen Kälberserums am stärksten, gefolgt von Humanem Serum und Albuminlösung 5%.

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung waren bei allen Zytoprotektiva die Lavasept®-Konzentrationen und die Octenidindihydrochloridlösung 0,1% sehr gut zellverträglich. Bei Chlorhexidindigluconatlösung 1,0% war der zytoprotektive Effekt sehr viel geringer ausgeprägt. Mit dieser Methode konnte mit allen Zytoprotektiva der gleiche Effekt wie bei der ATP-Messung beobachtet werden: FCS wies den ausgeprägtesten Effekt auf, Albuminlösung 5% erwies sich als am wenigsten zytoprotektiv, Humanes Serum lag in seinem zytoprotektiven Effekt dazwischen.

Beide Methoden sind qualitativ, nicht aber quantitativ miteinander vergleichbar, da aufgrund der Messgeräte bei der ATP-Messung nur 1.000 Zellen und bei der Durchflusszytometrie 500.000 Zellen eingesetzt wurden. Ein ausreichender antimikrobieller Effekt bei Anwesenheit von Albuminlösung 5%, FCS und Humanem Serum war bei allen eingesetzten Substanzen zu beobachten, wobei dieser bei Chlorhexidindigluconat und Octenidindihydrochlorid deutlich stärker war, als bei den beiden Lavasept®-Konzentrationen.

Der gewebeschützende Effekt der eingesetzten Zytoprotektiva korrelierte mit ihrem Proteingehalt. Fötales Kälberserum, dessen Hauptbestandteil BSA (Bovines Serumalbumin) ist, hatte den stärksten zytoprotektiven Effekt, gefolgt von Humanem Serum und Albuminlösung 5% mit dem geringsten Proteingehalt.

Der Unterschied in der Zytotoxizität zwischen den einzelnen Antiseptika bei Albuminlösung 5% ließ sich mit elektronenmikroskopischen Bildern belegen. Hier ließen sich bei Lavasept® und Octenidindihydrochlorid große Protein-Antiseptikum-Zusammenlagerungen erkennen, bei Lavasept® sogar eine Komplexierung der Zusammenlagerungen untereinander. Bei Chlorhexidindigluconat waren nur sehr kleine Zusammenlagerungen erkennbar.

Somit ließ sich die Hypothese aufstellen, dass bei Erhalt der antimikrobiellen Aktivität der zytoprotektive Effekt der 5% Albuminlösung bei Antiseptikaeinsatz direkt mit der Größe, der Anzahl und der Komplexierung der Zusammenlagerungen untereinander einhergeht.

6. Abkürzungsverzeichnis

®	Eingetragenes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Alb	Albumin
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection
BI	Biokompatibilitätsindex
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CAS-Nummer	Chemical Abstracts Service-Nummer,
Chx	Chlorhexidindigluconat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälber Serum
FL	fluoreszierend emittierendes Licht
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
HaCaT	Humane spontan immortalisierte Keratinocyten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
KBE	Koloniebildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysacharride
M	Molarität

min	Minute
MEM	Minimum Essential Medium, entwickelt von Harry Eagle
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mol	Stoffmenge
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
Na ₂ PO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NRU-Test	Neutral Red Uptake
O ₂	Sauerstoff
Oct	Octenidindihydrochlorid
PBS	phosphate buffered saline
PC	Personal Computer
pH	<i>Pondus hydrogenii</i>
PPi	Pyrophosphat
RLU	relative light units
s.o.	siehe oben
sec	Sekunden
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
SD	Standardabweichung
t	Zeit
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

7. Literaturverzeichnis

Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., Willems, G.M.

Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers
J Biol Chem. 265(9): 4923-8 (1990)

Babich, H., Borenfreund, E.

Cytotoxicity of T2-toxin and its metabolites determined with the neural red cell viability assay

Appl Environ Microbiol. 57(7): 2101-3 (1991)

Baden, H.P., Kubilus, J., Kvedar, J.C., Steinberg, M.L., Wolman, S.R.

Isolation and characterization of a spontaneously arising long-lived line of human keratinocytes (NM 1)

In Vitro Cell Dev Biol. 23(3): 205-13 (1987)

Bailey, D.M., DeGrazia, C., Hoff, S., Schulenberg, P., O'Connor, J., Paris, D., McKenzie Slee, A.

Bispyridinamines: A new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque

Jour Med Chem. 27: 1457-1464 (1984)

Berridge, V.M., Herst, P.M., Tan, A.S.

Tetrazolium dyes a tools in cell biology: new insights into their cellular regulation

Biotechnol Annu Rev. 11: 127-52 (2005)

Borenfreund, E., Puerner, J.A.

A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)

J Tissue Cult Methods. 9: 7-9 (1984)

Borenfreund, E., Puerner, J.A.

Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption

Toxicol Lett. 24(2-3): 119-24 (1985)

Boukamp, P., Petrussevska, RT., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.
Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte
cell line

J Cell Biol. 106(3): 761-71 (1988)

Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hülsen, A., Fasching, C., Cremer, T., Fusenig, N.
Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome
content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT

Genes Chromosomes Cancer. 19(4): 201-14 (1997)

Browne, A.C., Vearncombe, M., Sibbald, R.G.

High bacterial load in asymptomatic diabetic patients with neutrophilic ulcers retards
wound healing after application of Dermagraft

Ostomy Wound Manage. 47(10): 44-9 (2001)

Carrel, A.

In Sartory A: Le traitement des blessures par balle infectées

Le traitement de plaies de guerre. Lib Militaire Berger-Levrant, Paris (1917)

Ciarlone, A.E., Gangarosa, L.P., Fong, B.C.

Detection of p-chloroaniline in chlorhexidine solutions using thin-layer chromatography

J Dent Res. 55(5): 918 (1976)

Chhabra, R.S., Thompson, M., Elwell, M.R., Gerken, D.K.

Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice

Food Chem Toxicol. 28(10): 717-722 (1990)

Chhabra, R.S., Huff, J.E., Haseman, J.K., Elwell, M.R.

Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice

Food Chem Toxicol. 29(2): 119-124 (1991)

Creutz, C.E.

The annexins and exocytosis

Science. 258(5084): 924-31 (1992)

Curry, S.

Beyond expansion structural studies on the transport roles of human serum albumin
Vox Sang. 83 Suppl 1: 315-9 (2002)

Daeschlein, G., Assadian, O., Bruck, J.C., Meinl, C., Kramer, A., Koch, S.

Feasibility and clinical applicability of polyhexanide for treatment of second-degree burn wounds

Skin Pharmacol Physiol. 20(6): 292-96 (2007)

Day, J., Thorpe, S., Baynes, J.

Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum

J Biol Chem 254 (3): 595-7 (1979)

De Haan, B.B., Ellis, H., Wilks, M.

The role of infection on wound healing

Surg Gynecol Obstet. 138(5): 693-700 (1974)

Dolby, J., Gunnarson, B., Kronberg, L., Wikner, H.

Stability of chlorhexidine when autoclaving

Pharm Acta Helv. 47: 615-20 (1972)

Doughty, D.

A rational approach to the use of topical antiseptics

J Wound Ostomy Continence Nurs. 21: 224-31 (1994)

Dow, G., Browne, A., Sibbald, R.G.

Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment

Ostomy Wound Manage. 45(8): 23-40. Review (1999)

Eaglstein, W.H., Falanga, V.

Chronic wounds

Surg Clin North Am. 77(3): 689-700. Review (1997)

EN 1040

Chemical disinfectants and antiseptics. Basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1)

Europäisches Komitee für Normung. (1997)

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M.

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages

J Immunol. 148(7): 2207-16 (1992)

Giacometti, A., Cirioni, O., Greganti, G., Fineo, A., Ghiselli, R., Del Prete, M.S.,

Mocchegiani, F., Fileni, B., Caselli, F., Petrelli, E., Saba, V., Scalise, G.

Antiseptic compounds still active against bacterial strains isolated from surgical wound infections despite increasing antibiotic resistance

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 21(7): 553-6 (2002)

Goroncy-Bermes, P.

Investigation into the efficacy of disinfectants against MRSA and vancomycin-resistant enterococci

Zentralbl Hyg Umweltmed. 201(4-5): 297-309 (1998)

Gruber, R.P., Vistnes, L., Pardoe, R.

The effect of commonly used antiseptics on wound healing

Plast Reconstr Surg. 55(4): 472-6 (1975)

Hagenhofer, M., Germaier, H., Hohenadl, C., Rohwer, P., Kalden, J.R., Herrmann, M.

UV-B irradiated cell lines execute programmed cell death in various forms

Apoptosis. 3(2): 123-32 (1998)

Harke, H.P.

Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial active agent

Zbl Hyg. 188: 188-93 (1989)

Higgins, K.R., Ashry, H.R.

Wound dressings and topical agents

Clin Pediatric Med Surg. 12: 31-40 (1995)

Hipler, U.C., Fischer, T.W., Elsner, P.

HaCaT cell proliferation influenced by melatonin

Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 16(6): 379-85 (2003)

Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P., Roos, D.

Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro

Blood. 85(2): 532-40 (1995)

Ikeda, T., Tazuki, S., Watanabe, M.

Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes.

1. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain

Biochem Biophys Acta. 735: 380-6 (1983)

Izu, K., Yamamoto, O., Asahi, M.

Occupational skin injury by hydrogen peroxide

Dermatology. 201: 61-64 (2000)

Kallenberger, A., Kallenberger, C., Willenegger, H.

Experimentelle Untersuchungen zur Gewebeverträglichkeit von Antiseptika

Hyg Med. 16: 282-95 (1991)

Kangas, L., Grönroos, M., Nieminen, A.L.

Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro

Med Biol. 62(6): 338-43 (1984)

Kantor, J., Margolis, D.J.

A multicentre study of percentage change in venous leg ulcer area as a prognostic index of healing at 24 weeks

Br J Dermatol. 142(5): 960-4 (2000)

Kocher, T.

Die antiseptische Wundbehandlung mit schwachen Chlorzinklösungen in der Berliner Klinik. Sammlung kleiner Vorträge von R.Volkman (Hrsg.) 203/204
Breitkopf&Härtel, Leipzig 1703-1750 (1981)

König, B., König, W., Reimer, K.

Jod – die Stellung eines alten Desinfektionsmittels in der modernen Infektiologie
Dtsch Med Wschr. 122: 141 (1997)

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers, M.H.

Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis
Blood. 84(5): 1415-20 (1994)

Kramer, A., Adrian, V., Hesse, E., Weuffen, F.

Einfluß einer Chlorhexidin-haltigen Heilsalbe auf die Heilung experimenteller Hautschnittwunden auf Meerschweinchen.

In: Knoll, K. H. (Hrsg.) Realisierung der Krankenhaushygiene im Vereinten Europa. Bd 6. *Kongreß Angewandte Krankenhaushygiene, Marburg* 101-12 (1992)

Kramer, A., Adrian, V., Adam, C.

Comparison of the cytotoxicity of Lavasept® and selected antiseptic agents
Hyg Med. 18: 9-16 (1993)

Kramer, A., Adrian, V., Rudolph, P., Wurster, S., Lippert, H.

Explantationstest mit Haut und Peritoneum der neonatalen Ratte als Voraussagetest zur Verträglichkeit lokaler Antiinfektiva für Wunden und Körperhöhlen
Chirurg. 69: 840-5 (1998)

Kramer, A., Daeschlein, G., Kammerlander, G. et al.

Consensus recommendation for the choice of antiseptic agents in wound care
Hyg Med. 29(5): 147-57 (2004(1))

- Kramer, A., Roth, B., Müller, G., Rudolph, P., Klöcker, N.
Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets
Skin Pharmacol Physiol. 17(3): 141-6 (2004(2))
- Kramer, A., Müller, G., Assadian, O.
Indikationen und Wirkstoffauswahl zur
antiseptischen Therapie sekundär heilender Wunden
GMS Krankenhaushyg Interdiszip. 1(1): Doc32 (2006)
- Kujath, P., Michelsen, A.
Wunden – von der Physiologie zum Verband
Dtsch Arztebl. 105(13): 239-48 (2008)
- Leibovich, S.J., Ross, R.
The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum
Am J Pathol. 78:71-100 (1975)
- Lindskog, S., Pierce, A.M., Blomlöf, L.
Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space
Endod Dent Traumatol. 14(4): 186-90 (1998)
- Lister, J.
Der Lister'sche Verband (übersetzt von Tamahyn, O.)
Veith, Leipzig. (1875)
- Lovelock, J.E., Bishop, M.W.
Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide
Nature. 183(4672): 1394-5 (1959)
- Martin, P.
Wound healing – aiming for perfect skin regeneration
Science. 276(5309): 75-81 Review (1997)

Menke, H., Pelzer, M., Raff, T., Siebert, J., Germann, G.

Ein neues lokales Antiseptikum zur Oberflächenbehandlung bei Schwerstverbrannten
Akt Traumatol. 31: 211-5 (2001)

Meryman, H.T.

Cryoprotective agents

Cryobiology. 8(2): 173-83 (1971)

Mosmann, T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation
and cytotoxicity assays

J Immunol Methods. 65: 55-63 (1983)

Müller, G., Koburger, T., Jethon, F.U.W., Kramer, A.

Vergleich der bakterioziden Wirksamkeit und *In-vitro*-Zytotoxizität von Lavasept® und
Prontosan®

GMS Krankenhaushyg Interdiszip. 2(2): Doc 42 (2007)

Müller, G, Kramer, A.

Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial
activity and cellular cytotoxicity

J Antimicrob Chemother. 61(6): 1281-87 (2008)

Nelson, C.L., Schumann, D.J.

Instructional course lecture, vol. XXXI/2 : Preventive antibiotics

Amer Acad Orth surg. part II, 9-14 (1982)

Nemes, Z., Dietz, R., Lüth, J.B., Gomba, S., Hackenthal, E., Gross, F.

The pharmacological relevance of vital staining with neutral red

Experientia. 35(11): 1475-6 (1979)

Oltmans, P., Siebet, J.

Rote Hand Brief: Octenisept® Warnung vor nicht bestimmungsgemäßer Anwendung
bei der Wundspülung englumiger Stichkanäle

Schülke&Mayr 2009

Ovington, L.

Bacterial toxins and wound healing

Ostomy Wound Manage. 49(7A Suppl): 8-12 (2003)

Paixão-Cavalcante, D., van den Berg, C.W., de Freitas Fernandes-Pedrosa, M.,

Gonçalves de Andrade, R.M., Tambourgi, D.V.

Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by
Ixosceles venom sphingomyelinase D

J Invest Dermatol. 126(1): 61-8 (2006)

Payne, D.N., Babb, J.R., Bradley, C.R.

An evaluation of the suitability of the European suspension test to reflect in vitro
activity of antiseptics against clinically significant organisms

Lett Appl Microbiol. 28(1): 7-12 (1999)

Pitten, F.A., Werner, H.P., Kramer, A.

A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the
antimicrobial activity of antiseptics

J Hosp Infect. 55(2): 108-15 (2003)

Pringle, J.

Beobachtungen über Krankheiten der Armee (übersetzt von Brandle, AE.)

Richter'sche Buchhandlung, Altenburg (1772)

Rice, R.H., Steinmann, K.E., deGraffenried, L.A., Qin, Q., Taylor, N., Schlegel, R.

Elevation of cell cycle control proteins during spontaneous immortalization of human
keratinocytes

Mol Biol Cell. 4(2): 185-94 (1993)

Rietkötter, J., Körber, A., Grabbe, S., Dissemond, J.

Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a chronic wound by a new
polyhexanide hydrogel

J Eur Acad Dermatol Venereol. 21(10): 1416-7 (2007)

Rhim, J.S., Yoo, J.H., Park, J.H., Thraves, P., Salehi, Z., Dritschilo, A.
Evidence for the multistep nature of in vitro human epithelial cell carcinogenesis
Cancer Res. 50(17 Suppl): 5653S-5657S (1990)

Robson, M.C., Stenberg, B.D., Heggers, J.D.
Wound healing alterations caused by bacteria
Clin Plast Surg. 17(3): 485-93 (1990)

Rodeheaver, G., Smith, S., Thacker, J., Edgerton, M.T., Edlich, R.F.
Mechanical cleansing of contaminated wounds with a surfactant
Am J Surg. 129: 141-5 (1975)

Schäfer, G., Rieger, E.
Interaction of biguanides with mitochondrial and synthetic membranes. Effects on ion conductance of mitochondrial and electrical properties of phospholipid bilayers.
Eur J Biochem. 46(3): 613-623 (1974)

Schmidt-Neuerburg, K.P., Bettag, C., Schlickewei, W.
Wirksamkeit eines neuartigen Antiseptikums in der Behandlung kontaminierter Weichteilwunden
Chirurg. 72: 61-71 (2001)

Schönberger, W., Grimm, W.
Transiente Hyperthyreosen durch jodhaltige Desinfizientien bei Neugeborenen
Dtsch Med Wschr. 107: 1222-27 (1982)

Schreier, H., Erdos, G., Reimer, K., König, B., Fleische, W.
Molecular effects of povidone-iodine on relevant microorganisms: an elektronmicroscopic and biochemical study
Dermatology. 195(2): 111-116 (1997)

Sedlock, D.M., Bailey, D.M.
Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent
Antimicrob Agents Chemother. 28(6): 786-90 (1985)

Seliger, H.H., McElroy, W.D.

Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence

Arch Biochem Biophys. 88: 136-41 (1960)

Singer, A.J., Clark, R.A.

Cutaneous wound healing

N Engl J Med. 341(10): 738-46 (1999)

Skripitz, R., Werner, H.P.

Bakterizide Langzeitwirkung ausgewählter Antiseptika

Hyg Med. 19: 199-207 (1994)

Spitzbart, H.

Tolerance study on selected antiseptics using human vaginal membran *in vitro*.

Hyg Med. 19: 603-07 (1994)

Stanley, A., Wilson, M., Newman, H.N.

The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria

J Clin Periodontol. 16(4): 259-64 (1989)

Stone, L.L., Dalton, H.P., Haynes, B.W.

Bacterial debridement of the burn eschar: the in vivo activity of selected organisms

J Surg Res. 29(1):83-92(1980)

Verhoven, B., Schlegel, R.A., Williamson, P.

Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes

J Exp Med. 182(5): 1597-601 (1995)

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C.

A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V

J Immunol Methods. 184(1): 39-51 (1995)

Viljanto, J.

Disinfection of surgical wounds without inhibition of normal wound healing

Arch Surg. 115(3): 253-6 (1980)

Wollina, U., Hipler, U.C., Seeling, A., Oelschlager, H.

Investigations of interactions of chlormezanone racemate and its enantiomers on human keratinocytes and human leucocytes in vitro

Skin Pharmacol Physiol. 18(3): 132-8 (2005)

8. Danksagung

Mein Dank gilt meinen Doktorvätern Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen und Herrn Prof. Dr. Reinier Mutters, Herrn Keusgen vor allem für die Ermöglichung einer Dissertation außerhalb seines Instituts für Pharmazeutische Chemie am Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene. Herrn Mutters danke ich dafür, mich als externen Doktoranden angenommen und betreut zu haben.

Desweiteren danke ich Frau Claudia Trier und Frau Helene Bykow für ihre Unterstützung mit ihren praktischen Fertigkeiten im Labor;

Herrn Apotheker Daniel Schulze für seinen freundschaftlichen Rat;

meiner kleinen Tochter Martha, die bei dem Schreiben dieser wissenschaftlichen Arbeit mit ihrer fröhlichen Art und ihren strahlenden blauen Augen immer eine wunderbare Abwechslung war.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums.

Vor allem danke ich meiner lieben Frau Anna für ihre stetige Ermutigung und moralische Unterstützung, ohne sie gäbe es diese Arbeit sicher nicht.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, ohne erwähnt zu werden.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation

**Untersuchungen zur Zytoprotektion bei der Anwendung von Wundantiseptika
mittels Lumineszenzmessung und Durchflusszytometrie**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg an der Lahn, den 06. Oktober 2009

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Gernot Kissel
 Geboren: am 24. Mai 1978 in Cuxhaven
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet mit Anna Kissel, geb. Jaster
 eine Tochter

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule Waldesch
 1988 – 1997 Staatliches Gymnasium auf der Karthause
 in Koblenz

Beruflicher Werdegang:

1997 – 1999 Soldat auf Zeit für zwei Jahre mit
 Ausbildung zum Reserveoffizier der
 Bundeswehr
 1999 – 2003 Studium der Pharmazie an der Philipps –
 Universität in Marburg
 Abschluss: 2. Staatsexamen
 2003 – 2004 Praktisches Jahr in einer Öffentlichen
 Apotheke und in einer Krankenhaus-
 apotheke, 3. Staatsexamen und
 Approbation als Apotheker
 seit 2005 Promotionsstudium unter Leitung von
 Herrn Prof. Dr. Keusgen (Institut für
 Pharmazeutische Chemie) und Herrn Prof.
 Dr. Mutters am Institut für Krankenhaus-
 hygiene und Med. Mikrobiologie der
 Philipps – Universität Marburg und
 Tätigkeit als Apotheker in einer
 Öffentlichen Apotheke.